眼内新生血管に対する光化学治療

尾花 明¹⁾、郷渡有子¹⁾、三木徳彦¹⁾、中島 進²⁾、阪田 功³⁾、
竹村 健⁴⁾、平野 達⁵⁾

¹⁾ 大阪市立大学医学部眼科学教室、²⁾ 旭川医科大学、³⁾ 東洋薄荷工業、

⁴⁾ 北海道大学電子科学研究所、⁵⁾ 浜松ホトニクス

Photodynamic therapy on ocular neovascularization

Akira Obana¹⁾, Yuko Gohto¹⁾, Tokuhiko Miki¹⁾, Susumu Nakajima²⁾,
Isao Sakata³⁾, Takeshi Takemura⁴⁾, Toru Hirano⁵⁾

¹⁾ Department of Ophthalmology Osaka City University Medical School,

²⁾ Division of Surgery Operation Asahikawa Medical School,

³⁾ Toyo Hakka Kogyo, ⁴⁾ Research Institute for Electronic Science Hokkaido University,

⁵⁾ Hamamatsu Photonics

Abstract: The efficacy of photodynamic therapy using porphyrin sodium (PF) and newly-developed chlorin derivative (ATX-S10) for occlusion of corneal new vessels has been evaluated experimentally. Twenty-six albino rabbits were treated with an intravenous injection of 2mg/kg of PF, followed by argon green laser (514nm) irradiation to the corneal new vessels with three varieties of energy at 24, 48, 72 and 96 hours after the injection, respectively. In another group of 4 rabbits, diode laser (672nm) was irradiated with the energy from 43J/cm² to 323J/cm² at 4 and 6 hours after the administration of 12mg/kg of ATX-S10, respectively. The closure of corneal new vessels was confirmed by slit-lamp examination, fluorescein angiography and light microscopic study. With PF, irradiation with exposure energy of 19.1J/cm² during 24 and 72 hours after the administration was estimated to be suitable for the treatment, because new vessels were closed with a mild damage of the surrounding normal tissue such as the iris. Exposure energy more than 38.2J/cm² was thought to be excess since surrounding normal tissue was heavily damaged. With ATX-S10, selective closure of corneal new vessels were obtained by irradiation with exposure energy of 86J/cm² and 258J/cm² at 4 and 6 hours after the administration, respectively. In control groups which received laser irradiation without photosensitizer administration, new vessels were not closed. These results suggest PF and ATX-S10 used here are new therapeutic agents for the treatment of corneal neovascularization. Especially, ATX-S10 is a promising new photosensitizer since it has more rapid elimination from the body and less skin phototoxicity than PF.

I 緒言

種々の眼疾患で網膜、脈絡膜、角膜、虹彩などに新生血管が生じ、いずれも重篤な視機能障害を来す。なかでも脈絡膜新生血管を生じる加齢

性黄斑変性は、近年増加傾向にあり、高齢者の失明原因として最も重要である。眼内新生血管に対する治療には従来よりレーザー光凝固術が行われているが、新生血管の残存、再発や治療後の視力

低下などの問題がある。特に術後視力の低下は、凝固部周囲への熱拡散による神経組織の障害によるものであり、周囲組織を障害せずに新生血管のみを閉塞しうる新しい治療法が望まれている。それに対して光化学治療には腫瘍内血管の閉塞効果が証明されており^{1,4)}、しかも熱による周囲組織の直接的障害がないことから、新生血管治療に期待されている⁵⁾。

そこで、臨床応用の可能性があるポルフィマーナトリウムによる実験的角膜新生血管の光化学治療の至適治療条件を調べ、さらに、新しく開発したATX-S10⁶⁾でも新生血管閉塞の可能性を検討した。

II 実験方法

1. 角膜新生血管モデル作成法

徐放性基材 Ethylene-vinyl acetate copolymer でウシ塩基性線維芽細胞増殖因子（以下 bFGF, R&D systems）500ng を包んだペレットを作成した⁷⁾。成熟白色家兎を塩酸ケタミン（ケタラル[®]）20mg/kg とキシラジン塩酸塩（セラクタール[®]）0.1ml/kg の筋注で全身麻酔後、上方の角膜輪部から約3mm離れた角膜実質内にペレットを包埋し、2週後に角膜新生血管が輪部からペレットまで達したものを実験モデルとした。なお、後述のATX-S10 蛍光造影には、角膜通糸法で新生血管を作成した眼を使用した。

2. 光感受性物質

ポルフィマーナトリウム（フォトフリン注[®]、日本レダリー、以下PF）は暗所で冷蔵保存し、使用直前に5%ブドウ糖液にて溶解した。ATX-S10（13,17-bispropionylaspartic acid-3-ethenyl-7-hydroxy-8-hydroxyiminoethylidene-2,7,12,18-tetramethyl-porphine、東洋薄荷工業）水溶液は暗所で冷蔵保存したものを使用した。

3. 光化学治療

(1) PFによる治療

家兎耳静脈からPF 2.5mg/mlブドウ糖溶液を2mg/kg体重の割合で注射し、静注後は暗所で飼育した。静注後24、48、72、96時間目に前記全身麻酔下で、新生血管を中心とした直径1cmの範囲に新生血管と垂直方向からアルゴン緑レーザー（波長514nm）を照射した。照射条件は弱度（角膜表面上の出力63.7mW/cm²で5分間照射、総照射量19.1J/cm²）、中等度（同出力で10分間照射、総照射量38.2J/cm²）、強度（出力127.4mW/cm²で20分間照射、総照射量152.9J/cm²）の3種類とした。照射3時間後、3日後、1週後、2週後に細隙灯顕微鏡、倒像鏡で前眼部と眼底を観察後、前眼部蛍光造影を行った。各時点で全身麻酔下に眼球摘出し、角膜と虹彩の組織切片標本を作成後、光学顕微鏡（以下、光顕）で観察した。なお、実験動物数は26匹50眼であった。

(2) ATX-S10による治療

ATX-S10投与後に、新生血管と周囲組織のATX-S10濃度差が大きくなる時期を推定するために、ATX-S10を12mg/kg静注し、直後から28時間後まで前眼部蛍光造影を行った。次に12mg/kg静注4および6時間後に、半導体レーザー（波長672nm、浜松ホトニクス）を新生血管に対して直径5mmの照射径で照射した。照射強度は43～323J/cm²の間で変化させた。実験動物数は4匹8眼であった。

(3) 対照実験

3匹3眼に対して光感受性物質を静注せずに、アルゴン緑レーザーまたは半導体レーザーを出力127.4mW/cm²で20分間照射し、直後と翌日に細隙灯および蛍光造影を行い、角膜と虹彩の組織切片標本を光顕で観察した。

III 結果

(1) PFによる治療

図1 PF 静注 24 時間後の弱度照射例。治療 3 時間後の前眼部写真。新生血管は暗赤色調を呈する。

図2 図1と同一眼の蛍光造影写真。新生血管は閉塞している。虹彩の障害は軽度である。

PF 静注 24～72 時間後の治療では弱度～強度のいずれの照射強度でも、治療 3 時間後には新生血管は暗赤色で管径が太くなり（図1）、蛍光造影で色素流入がなく（図2）、閉塞していることが確認された。光顕標本では新生血管腔内に赤血球が充満し、所々の血管壁に血栓形成がみられた。静注 96 時間後の弱度照射では新生血管は閉塞せず、中等度、強度照射では閉塞が得られた。中等度、強度照射ではいずれの治療条件でも治療 1 週間後に、治療した新生血管は閉塞していたが、それとは異なる新生血管の激しい再発がみられた。弱度照射での再発はごくわずかであった。また、照射野内の虹彩血管の障害は、弱度照射ではいずれの治療条件でも軽度で、治療 3 日～1 週後に一部の虹彩血管閉塞を認めるものの、2 週後には再疎通した。それに対し、中等度、強度照射では 2 週後には閉塞した虹彩血管の再疎通はみられたが、虹彩出血や、特に強度照射では前房出血が生じた。また、中等度、強度照射では眼底への透過光で脈絡膜出血や脈絡膜血管閉塞が生じた。以上の結果を表 1 にまとめた。角膜新生血管が閉塞しない場合を治療不足、角膜新生血管が閉塞し、虹彩の障害が軽度の場合を治療適当、新生血管は閉塞しても虹彩や眼底の障害が生じる場合を過剰治療とした。

表 1 PF による角膜新生血管治療

	PF 静注から治療までの時間			
	24	48	72	96（時間）
弱度照射	適当	適当	適当	不足
中等度照射	過剰	過剰	過剰	過剰
強度照射	過剰	過剰	過剰	過剰

(2) ATX-S10 による治療

ATX-S10 による蛍光造影では、静注開始とともに角膜新生血管および虹彩血管への色素流入が観察された（図3a）。30 分後には新生血管から色素漏出がみられ、血管像を 1 本づつ区別しにくくなったが、新生血管は全体として明るく造影され、虹彩も全体的に明るく造影された。1 時間後以降は新生血管は明るく造影されたが、虹彩の蛍光は次第に弱くなり、3～5 時間後に新生血管と虹彩の蛍光強度にもっとも強い差がみられた（図3b）。7 時間後には新生血管の蛍光も弱くなり、28 時間後にはごくわずかの蛍光がみられるのみとなった。

ATX-S10 静注 4 時間後のレーザー照射眼では、照射強度 43 J/cm^2 では一部の新生血管のみが閉塞し、 86 J/cm^2 以上では全ての新生血管が閉塞した（図4）。しかし、 172 J/cm^2 以上では虹彩や脈絡膜血管の閉塞もみられた。6 時間後の照射では照射

図3a ATX-S10による
蛍光造影写真。静注56秒
後。新生血管、虹彩血管が
明瞭に造影されている。

図3b 静注3時間後。虹
彩の蛍光は弱い、新生
血管の蛍光は残存してい
る。

図4 ATX-S10 静注4時
間後の86J/cm²照射例。
治療3時間後の蛍光造影
写真。新生血管は閉塞し、
虹彩の障害は軽度である。

強度143J/cm²では新生血管は閉塞せず、258J/cm²以上で閉塞した。しかし、323J/cm²では虹彩血管の閉塞もみられた。

(3) 対照実験

対照実験ではアルゴン緑レーザーおよび半導体レーザー照射眼では新生血管、虹彩、眼底に変化はみられなかった。蛍光造影では新生血管に色素流入を認めた。光顕では新生血管、虹彩血管は開存していた。

IV 考按

角膜、虹彩、網膜、脈絡膜など種々の組織に新生血管が生じ、いずれもが光化学治療の検討対照になり得るが、今回は実験的に作成しやすく、観察の容易な角膜新生血管を実験モデルに使用した。

PFによる治療では、静注24～72時間後の弱度照射で新生血管の閉塞が得られ、虹彩など周囲組織の障害も許容範囲内であることが解った。中等度、強度照射では治療時期に関わらず新生血管は閉塞したが、1週後の新生血管再発と、虹彩、眼底血管の障害が問題であった。新生血管再発の原因はペレット内のbFGFの残存以外に、血液眼柵の破綻による炎症によって促進されたことが考えられた。しかし、今回の結果から、治療条件を整えれ

ば、周囲の障害を軽度を抑えて、新生血管を閉塞しうることが明らかとなった。

ATX-S10による治療では、治療開始の最適時間が不明であったが、ATX-S10 蛍光造影の結果から、静注3～5時間後頃に新生血管と周囲組織の濃度差が大きくなることが推測されたので、今回は静注4および6時間後に治療を行ってみた。その結果、4時間後照射では86J/cm²、6時間後照射では258J/cm²の照射で、周囲の障害を軽度にして新生血管が閉塞できることが解った。なお、本実験では照射出力が小さいこと、対照実験で変化がなかったことから、血管閉塞効果はレーザーの熱作用ではなく、PF、ATX-S10と各レーザーによる光化学反応によるものと考えた。

PF、ATX-S10ともに眼内の新生血管治療に期待がもたれる。特にATX-S10は我々の家兎での血中濃度測定で、半減期が約30分とPFに比べて短いため、臨床使用に際して光線過敏症の点からも入院期間の短期化が期待でき、今後さらに適切な治療条件の検討を行う予定である。

文献

- 1) Bugelski PJ, Porter CW, Dougherty TJ: Autoradiographic distribution of hematoporphyrin

derivative in normal and tumor tissue of the mouse. Cancer Res. 41: 4604-4612,1981.

2)Star WM, Marijnissen JPA, Van Den Berg-Block AE, Reinhold HS: Destructive effect of photoradiation on the microcirculation of a rat mamary tumor growing in 'sandwich' observation chambers. Progress in Clinical and Biological Research, 170, In:Doiren DR, et al(Eds),637-645 Alan R Liss: New York, 1984.

3)Selman SH, Kreimer-Birnbaum M, Klaunig JE, Goldblatt PJ, Keck RW, Britton SL: Blood flow in transplantable bladder tumors treated with hematoporphyrin derivative and light. Cancer Res 44:1924-1927,1984.

4)Berenbaum MC, Hall GW, Hoyes AD: Cerebral photosensitization by haematoporphyrin derivative. Evidence for an endothelial site of action. Br J Cancer 53:81-89,1986.

5)Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Gragoudas E, Michaud N, Flotte TJ, Birngruber R: Vascular targeting in photodynamic occlusion of subretinal vessels. Ophthalmology 101:1953-1961,1994.

6)Nakajima S,Takemura T,Sakata I:Acoustic,fluorescent diagnosis of malignant lesions using by HAT-D01 and ATX-S10. SPIE 2371:495-500,1995.

7) 須藤勝一、藤田 剛：血管新生とその制御ー薬剤開発の立場から。眼紀40：1431-1443,1989.