ヘマトポルフィリン誘導体による 実験的角膜新生血管の光化学治療 Photodynamic Therapy of Experimental Corneal Neovascularization Using Hematoporphyrin Derivatives

尾花 明, 郷渡 有子, 松本 宗明, 三木 徳彦

大阪市立大学医学部眼科学教室

〒545 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-5-7

TEL 06-645-2176 FAX 06-634-3873

Akira Obana, Yuko Gohto, Muneaki Matsumoto and Tokuhiko Miki

Department of Ophthalmology, Osaka City University Medical School

1-5-7 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka-shi, Osaka-hu 545, Japan

要 旨

ポルフィマーナトリウムによる光化学治療が角膜新生血管の閉塞に有効かどうかを実験的に検討した。白色家兎眼にペレット包埋法で角膜新生血管を作成後、ポルフィマーナトリウム 2 mg/kg体重を静注し、24, 48, 72時間後にアルゴン緑レーザー (514nm) を 3 種類の強度で照射した。新生血管閉塞の有無を細隙灯顕微鏡と蛍光造影検査、光学顕微鏡標本で観察した。照射強度 38.2 J/cm² 以上では新生血管は閉塞するものの、照射野内の虹彩等の新生血管周囲の組織も強く障害された。今回検討した条件では 19.1 J/cm² の照射を静注後 24~72 時間の間に行うのが、周囲の正常組織障害を軽度抑えて新生血管を閉塞できる治療条件であることが判明した。光感受性物質非投与下でレーザーを照射した対照実験では、新生血管閉塞や虹彩の障害を認めなかった。治療眼の血管閉塞が熱作用によるとは考えられない。本光感受性物質を使用した光化学治療は眼科領域の新生血管閉塞の新しい方法として期待できる。

キーワード：光化学治療，角膜新生血管，ヘマトポルフィリン誘導体，アルゴンレーザー，家兎眼

Abstract

The efficacy of photodynamic therapy using porphyrmer sodium for occlusion of corneal neovascularization has been evaluated experimentally. After the corneal neovascularization had been developed on albino rabbit eyes by a pellet mounting method, 2 mg/kg of porphyrmer sodium was administered intravenously. Argon green laser (514nm) was irradiated to the cornea with three varieties of energy at 24, 48, 72 and 96 hours after the administration, respectively. Slit-lamp examination, fluorescein angiography and light microscopic study were performed to observe whether the

(平成 7 年 12 月 28 日受理, 平成 8 年 3 月 7 日掲載決定)

(Received December 28th 1995, Accepted March 7th 1996)

corneal new vessels were closed or not. With the exposure energy more than 38.2 J/cm², new vessels were occluded but surrounding normal tissues in the irradiation area such as the iris were severely damaged. Irradiation with exposure energy of 19.1 J/cm² during 24 and 72 hours after the administration of porphyrin sodium was estimated more suitable to the treatment, because new vessel closure was obtained with a mild damage of the surrounding normal tissue. Since new vessels were not closed in control groups which received laser irradiation without photosensitizer administration, it was supposed that the closure was not induced by thermal effect. The results of the present study suggested that photodynamic therapy using this photosensitizer was a new useful therapeutic agent for occlusion of ocular neovascularization.

Key words : Photodynamic therapy, Corneal neovascularization, Hematoporphyrin derivatives, Argon laser, Rabbit eye

I 緒 言

ヘマトポルフィリン誘導体(HPD)¹⁾を用いた光化学治療は、Doughertyら²⁾の研究により悪性腫瘍の新たな治療法として注目されるようになった。悪性腫瘍の退縮効果は光化学作用で生じた活性酸素などのフリーラジカルが腫瘍細胞を直接破壊すると考えられていた。しかし、光感受性物質の病巣局所への流入や酸素の供給に、血管系が重要な役割を果たすことから腫瘍血管への作用が注目され始め^{3)~5)}、血管内皮細胞の障害が証明されて⁶⁾、腫瘍の退縮効果は腫瘍細胞への直接作用以外に、腫瘍血管の閉塞による虚血の影響が考えられるようになった。光化学治療の血管への作用が研究されるにつれ、眼科領域では新生血管治療への応用が考えられ、これまで動物実験で角膜新生血管^{8)~11)}、虹彩ルベオシス^{12)・13)}、網膜血管^{14)~16)}、網膜前新生血管¹⁷⁾、脈絡膜血管^{14)・16)・18)・19)}、脈絡膜新生血管^{20)・21)}に対して、種々の光感受性物質を用いた検討がなされてきた。

一方、我が国では1980年代から早田、加藤ら^{22)~24)}によりHPDによる悪性腫瘍の治療が詳細に検討され、本年HPDであるポルフィマーナトリウム(フォトフリン注[®]、日本レダリー)が市販され、肺癌、食道癌、胃癌、子宮癌に対して臨床使用が可能となった。これによりポルフィマーナトリウムの人体投与の安全性が認められたわけで、今後、悪性腫瘍以外にも適応拡大の可能性がひらけた。そこで、我々は眼内に生じる新生血管治療にポルフィマーナトリウムを用いた光化学治療が有効かどうかを検討する目的で、実験的角膜新生血管を閉塞する研究を行った。

II 実験方法

1. ペレット包埋法による角膜新生血管モデル作成方法
細隙灯および倒像鏡検査で前眼部と眼底に異常の認められない成熟白色家兎28匹53眼を使用した。Ethylene-vinyl acetate copolymer EVA)を徐放性基材としてウシ塩基性線維芽細胞増殖因子(以下bFGF, R & D systems) 500ngを含んだペレットを作成し²⁵⁾、塩酸ケタミン(ケタラル[®])20mg/kgとキシラジン塩酸塩(セラク[®]) 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た。2週間前後で角膜新生血管が輪部からペレットまで達したものをモデルとして使用した。

2. 光感受性物質

ヘマトポルフィリン誘導体であるポルフィマーナトリウム(フォトフリン注[®])を使用した。本品はPolyhematoporphyrin esters-ethersを90%以上、とくにdihematoporphyrin ester-etherを約70%含む。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。

3. 光化学治療

治療前の前眼部写真を撮影した。次に、耳静脈からポルフィマーナトリウムの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にてアルゴン緑レーザー(514nm)を照射した。照射は新生血管の生じている角膜表面と垂直方向から、新生血管全体が照射野の中央に位置するようにして、直径1cmの範囲に行った。照射条件は弱度、中等度、強度の3種類とした。すなわち、弱度照射は角膜表面上の出力63.7mW/cm²で5分間照射(総照射量19.1J/cm²)、中等度照射は同出力で10分間照射(総照射量38.2J/cm²)、強度照射

表1 照射条件と観察眼数

弱度照射

		レーザー照射から観察までの期間			
		3時間	3日	1週	2週
ポルフィマーナトリウム	24	3 (1)	2 (1)	1 (0)	1 (1)
静注からレーザー照射までの時間 (時間)	48	2 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (1)
	72	2 (0)	2 (1)	1 (0)	1 (1)
	96	1 (0)	1 (0)	1 (1)	0 (0)

() 内は組織切片標本作成眼数

中等度照射

		レーザー照射から観察までの期間			
		3時間	3日	1週	2週
ポルフィマーナトリウム	24	5 (1)	4 (1)	2 (1)	1 (1)
からレーザー照射までの時間 (時間)	48	4 (1)	3 (1)	2 (1)	1 (1)
	72	4 (1)	3 (1)	2 (1)	1 (1)
	96	4 (1)	3 (1)	2 (1)	1 (1)

() 内は組織切片標本作成眼数

強度照射

		レーザー照射から観察までの期間			
		3時間	3日	1週	2週
ポルフィマーナトリウム	24	8 (2)	6 (2)	3 (1)	2 (2)
からレーザー照射までの時間 (時間)	48	6 (2)	4 (1)	3 (1)	2 (2)
	72	6 (1)	5 (2)	3 (1)	2 (2)
	96	5 (1)	4 (1)	3 (2)	1 (1)

() 内は組織切片標本作成眼数

は出力127.4mW/cm²で20分間照射 (総照射量152.9J/cm²) であった。照射中は角膜の乾燥を防ぐため、適宜生理食塩水を点眼した。

照射約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し、前眼部および眼底写真撮影と前眼部蛍光造影撮影を行った。また、各時点で全身麻酔下で眼球摘出し、カルノフスキー液とオスミウム酸による2重固定後、型どりの処理でエポキシ樹脂に包埋した。角膜と虹彩の組織切片標本作成し、光学顕微鏡 (以下、光顕) で観察した。各照射条件と細隙灯、倒像鏡、蛍光造影検査および組織標本観察施行眼は表1のごとくとした。

4. 対照実験

ポルフィマーナトリウムを静注せずに、アルゴン緑レーザーを2匹2眼に出力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検査で新生血管閉塞の有無を検討し、さらに、角膜と虹彩の組織切片標本を光顕で観察した。また、1匹1眼はポルフィマーナトリウムの静注のみを行い、レーザー照射を行わずに他と同様の条件で飼育し、静注直後、1週後、2週後に細隙灯検査、直後と2週後に蛍光造影検査を行い、新生血

管閉塞の有無を観察した。

Ⅲ 結 果

1. 細隙灯顕微鏡、倒像鏡、蛍光造影所見

角膜新生血管の閉塞状況はポルフィマーナトリウム静注からレーザー照射までの時間よりも、照射強度によってほぼ一定の傾向がみられたので、まず、各照射強度での典型例の所見を記載する。

1) 弱度照射 (ポルフィマーナトリウム静注24時間後に照射した眼)

レーザー照射終了3時間後の細隙灯検査で、新生血管は血管径が太くなり、色調は照射前 (図1) の赤色から暗赤色に変化した (図2)。レーザー照射野内の角膜、虹彩に著変はなく、瞳孔は正円であった。照射野の結膜にわずかの浮腫を認めた。蛍光造影では新生血管の1本は造影されたが、他は造影されず、照射野中央に位置する虹彩に軽度の色素漏出を認めた (図3)。3日後には細隙灯検査で新生血管は不明瞭で、ペレット周囲の角膜に出血と軽度の混濁が生じた。照射野内の虹彩に出血がみられた。結膜浮腫は軽減した (図4)。蛍光造影で新生血管は造影されず、照射野中央の虹彩に充盈欠損がみ

図1 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療前前眼部写真。
角膜輪部からペレット（矢尻）に達する角膜新生血管（矢印）がみられる。

図3 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療3時間後の蛍光造影写真。
（造影開始1分39秒）
矢印の新生血管には色素流入はみられず、照射野内の虹彩に軽度の過蛍光がみられる。

図2 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療3時間後の前眼部写真。
矢印で囲まれた範囲がほぼレーザー照射部位である。矢印の新生血管は暗赤色を呈し、治療前よりやや太い。結膜浮腫はごく軽度である。

図4 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療3日後の前眼部写真。
新生血管は不明瞭で、ペレット周囲の角膜と虹彩に出血がみられる。結膜浮腫は軽快している。

られた（図5）。1週後には治療対象の新生血管は不明であったが、治療時にはなかった新生血管が角膜輪郭にわずかに出現していた。角膜混濁は軽快し、虹彩には著変を認めなかった。蛍光造影では元の新生血管は造影されなかった。照射野の虹彩の充盈欠損は3日後から明らかに改善した。2週後には元の新生血管は消失していた

が、治療後に出現した新生血管が1週後と同程度にみられた（図6）。照射部の虹彩に変化はみられなかった。蛍光造影では元の新生血管は造影されなかった。照射野の虹彩の充盈欠損は改善された。なお、全経過を通じて非照射部の角膜、虹彩、結膜と眼底には異常を認めなかった。

図5 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療3日後の蛍光造影写真。
(造影開始1分39秒)
新生血管は造影されず、照射野中央の虹彩と輪部近くの結膜は低蛍光を呈する。

図6 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療2週後の前眼部写真。
元の新生血管は消失し、治療後出現した新生血管(矢印)は1週後と同程度である。

2) 中等度照射 (ポルフィマーナトリウム静注72時間後に照射した眼)

レーザー照射終了3時間後の細隙灯検査では、新生血管は血管径が太く暗赤色になり、血流がみられなかった。角膜混濁は生じなかった。レーザー照射野の虹彩は白色調で瞳孔縁の虹彩血管が暗赤色となった。瞳孔はほぼ正

図7 ポルフィマーナトリウム静注72時間後の中等度照射例。治療3時間後前眼部写真。
矢尻で囲まれた範囲がほぼレーザー照射部位である。矢印の新生血管は暗赤色を呈し、治療前よりやや太い。照射野内の虹彩は白色調で、瞳孔縁には充血がみられる。結膜浮腫がみられる。

図8 ポルフィマーナトリウム静注72時間後の中等度照射例。治療3時間後の蛍光造影。
(造影開始1分8秒)
新生血管は造影されない。照射野の虹彩は瞳孔縁で低蛍光、その他で過蛍光を呈する。結膜血管の充盈欠損がみられる。

円であったが、照射野以外の瞳孔縁に充血を認めた。結膜浮腫を軽度認めた(図7)。蛍光造影では新生血管は造影されず、照射野の瞳孔縁虹彩血管の充盈欠損と他の

図9 ポルフィマーナトリウム静注72時間後の中等度照射例。治療3日後の前眼部写真。
新生血管は暗赤色で、周囲の角膜混濁がみられる。
照射野内の虹彩には線状、斑状出血がみられる。

図10 ポルフィマーナトリウム静注72時間後の中等度照射例。治療3日後の蛍光造影写真。
(造影開始1分16秒)
新生血管は造影されない。照射野内の虹彩は低蛍光を呈する。

虹彩血管からの色素漏出が認められた。結膜血管の充盈欠損もみられた(図8)。3日後には新生血管は暗赤色で血流がみられず、周囲の角膜混濁がみられた。照射野の虹彩は白色調を呈し、線状および斑状出血がみられ、瞳孔はわずかに縦長の楕円形を呈した。結膜浮腫は軽減した(図9)。蛍光造影では新生血管は造影されず、照

図11 ポルフィマーナトリウム静注72時間後の中等度照射例。治療1週後の前眼部写真。
治療された元の新生血管は消失しているが、治療時にはなかった密な新生血管(矢印)が出現している。角膜混濁は3日後よりやや軽減している。虹彩出血がみられる。

射野の虹彩に充盈欠損と出血による蛍光のブロックがみられた(図10)。眼底検査では視神経乳頭下方の後極部に限局的に脈絡膜血管が疎で脈絡膜出血を伴うところが見られた。1週後には新生血管は不明で、角膜混濁は3日後からやや軽減がみられた。しかし、治療前にはなかった新生血管が照射野辺縁の角膜輪部から角膜中央に向かって密に伸びていた。照射野の虹彩は白色調を呈し出血がみられた(図11)。蛍光造影では元の新生血管は造影されなかったが、照射野の虹彩には充盈欠損と出血によるブロックがみられた。眼底検査では3日後に脈絡膜出血の存在した部位に脈絡膜大血管の狭小化がみられた。2週後には照射野辺縁から伸展した多数の新生血管は消退傾向を示し、比較的疎な新生血管がみられた。照射野の虹彩は白色調を呈したが、出血は消退傾向を示し、瞳孔は縦長の楕円形であった。蛍光造影では再発血管が造影され、虹彩の充盈欠損部は小さくなった。眼底所見は1週後と同様であった。

3) 強度照射(ポルフィマーナトリウム静注48時間後に照射した眼)

レーザー照射終了3時間後の細隙灯検査で新生血管は太く暗赤色に変化し、血流の途絶がみられた。照射野の虹彩は白色調を呈した。強い結膜浮腫を来したが、角膜の変化は認めなかった。瞳孔は軽度散大した(図12)。蛍光造影では新生血管は一部を除いて、大半は造影され

図12 ポルフィマーナトリウム静注48時間後の強度照射例。治療3時間後の前眼部写真。
新生血管は暗赤色で、血流途絶がみられる。結膜浮腫は高度である。

図14 ポルフィマーナトリウム静注48時間後の強度照射例。治療3日後の蛍光造影写真。(造影開始17秒)
照射野に相当する範囲は低蛍光を呈する。すなわち新生血管、虹彩血管、結膜血管は造影されない。

図13 ポルフィマーナトリウム静注48時間後の強度照射例。治療3日後の前眼部写真。
新生血管には血流途絶がみられ、周囲の角膜混濁は高度である。照射野の虹彩は白色調で、その周囲には充血がみられる。瞳孔は散大している。結膜浮腫がみられる。

なかった。照射野の虹彩には充盈欠損が生じ、その周囲に色素漏出がみられた。照射野内の結膜血管も造影されなかった。3日後には新生血管は暗赤色で血流は途絶し、角膜混濁が著名であった。照射野の虹彩は白色調で、非照射部虹彩の充血が著名であった。結膜浮腫はやや軽減

したが、充血がみられた。瞳孔は散大していた(図13)。蛍光造影では新生血管、照射野内の虹彩血管、結膜血管の充盈欠損が認められた(図14)。眼底検査では後極部に網膜下出血、網膜出血、硝子体出血がみられた。1週後には元の新生血管は細い筋状となったが、新たな新生血管が照射野辺縁の角膜輪部から密に増殖した。照射野虹彩の白色化と、非照射部虹彩の充血、出血と、前房出血がみられた。結膜浮腫は消退したが、充血はみられた。瞳孔は散大していた。蛍光造影では新生血管、照射野内の虹彩血管、結膜血管の充盈欠損が認められた。照射野周囲の虹彩血管から色素漏出がみられた。眼底検査では後極部に網膜下出血を伴う限局性網膜剥離、網膜出血、硝子体出血がみられた。2週後には元の新生血管は不明瞭だが、それとは異なる新生血管が多数みられ、角膜は混濁していた。照射野の虹彩は白色で、拡張、蛇行した血管がみられた。非照射部の虹彩血管の拡張もみられた。前房内に血腫が存在した(図15)。蛍光造影では元の新生血管は造影されないが、それとは異なる新生血管が多数造影された。眼底検査では後極部に約8乳頭径大の脈絡膜血管の観察されない部位と網膜出血、網膜前出血がみられた。

2. 組織学的所見

組織学的所見は治療条件に関わらず、細隙灯および蛍光造影検査所見に応じた変化を示した。つまり、レーザー照射直後と3日後に血流のみられなかった標本では、新生血管の管腔内に赤血球が充満し、所々の血管壁に血栓

図15 ポルフィマーナトリウム静注48時間後の強度照射例。治療2週後の前眼部写真。
照射野辺縁の輪部から新生血管の伸展がみられる。
虹彩出血と前房内の凝血塊が存在する。

図16 ポルフィマーナトリウム静注24時間後の弱度照射例。治療3時間後の角膜光顕写真。
(トルイジンブルー染色, バー=100 μ m)
新生血管腔には赤血球の充満や血栓形成がみられる。

形成がみられた(図16)。また、角膜実質内の出血がみられた。1週から2週後に新生血管の再疎通や新たな血管の発生がみられた標本では、管腔の開存した血管が認められた。中等度および強度照射では再発した血管周囲に白血球の浸潤がみられた。

虹彩は、蛍光造影で充盈欠損のあった標本では管腔内に血栓形成と赤血球の充満した血管がみられたが、管腔

図17 ポルフィマーナトリウム静注48時間後の弱度照射例。治療3時間後の虹彩光顕写真。
(トルイジンブルー染色, バー=100 μ m)
管腔の保たれた血管と、血栓と赤血球の充満で閉塞した血管がみられる。

の開存した血管もみられた(図17)。充盈欠損がなく漏出のみであった標本では血管腔の開存がみられ、血管壁の異常はみられなかった。

以上、各照射強度の典型的所見を記載したが、表2に今回観察した全ての眼の結果をまとめた。新生血管の閉塞とは細隙灯、蛍光造影検査で血流の途絶が認められた場合で、この内光顕標本観察も行えたものでは管腔内に赤血球の充満と血栓形成がみられた。再疎通とは一度閉塞した新生血管に再度血流が認められた場合で、再発とは元の新生血管とは異なる血管が生じた場合を意味する。虹彩の所見はレーザー照射野内の変化のみを記したもので、漏出とは蛍光造影検査で色素の漏出を認めた場合、閉塞とは蛍光造影検査で充盈欠損を認め、光顕標本で血栓形成による管腔閉塞を認めた場合である。虹彩出血、前房出血は細隙灯で観察されたものである。なお、表中の各所見の眼数の合計が観察眼数を超過している箇所は、それらの所見が同一眼に重複してみられたものである。

3. 対照実験の結果

対照実験ではアルゴン緑レーザー照射眼ならびにポルフィマーナトリウム投与のみの眼では、新生血管に変化はみられず、角膜、虹彩、眼底の異常も認めなかった。また、蛍光造影検査では新生血管に色素の流入を認めた(図18)。組織学的には角膜実質内に血管腔を認め、虹彩血管の異常はみられなかった。

表2 治療条件別の角膜新生血管閉塞および虹彩障害を来した眼数

弱度照射

			レーザー照射から観察までの期間			
			3時間	3日	1週	2週
ポルフィマー ナトリウム静注 からレーザー 照射までの時間 (時間)	24	CNV	閉塞2/3	閉塞1/2	再発1/1	再発1/1
		IR	漏出1/3	閉塞1/2	閉塞1/2	再疎通1/1
	48	CNV	閉塞2/2	閉塞1/1	再発1/1	再発1/1
		IR	漏出2/2 閉塞1/2	閉塞1/1	閉塞1/1	再疎通1/1
	72	CNV	閉塞2/2	閉塞2/2	再発1/1	再疎通および再発1/1
		IR	漏出2/2 閉塞1/2	閉塞1/1	再疎通1/1	再疎通1/1
	96	CNV	閉塞0/1	閉塞0/1	閉塞0/1	
		IR			(全て変化なし)	
			CNV: 角膜新生血管, IR: 虹彩			
			各所見を呈した眼数/検査眼数			

中等度照射

			レーザー照射から観察までの期間			
			3時間	3日	1週	2週
ポルフィマー ナトリウム静注 からレーザー 照射までの時間 (時間)	24	CNV	閉塞4/5 出血1/5	閉塞4/4 出血1/4	再発2/2	再発1/1
		IR	漏出5/5	漏出1/4 閉塞3/4 出血1/4	一部再疎通2/2	再疎通1/1
	48	CNV	閉塞4/4	再疎通1/3 閉塞2/3	再疎通2/2	再疎通1/1
		IR	漏出4/4	閉塞3/3 出血1/3	閉塞2/2	一部再疎通1/1
	72	CNV	閉塞4/4	閉塞3/3	再発2/2	再発1/1
		IR	漏出4/4	閉塞3/3 出血3/3	閉塞2/2 出血2/2	一部再疎通1/1 出血1/1
	96	CNV	閉塞3/4	閉塞2/3	再疎通1/1	再疎通1/1
		IR	漏出4/4	閉塞2/3 出血3/3	閉塞1/2 出血2/2	再疎通1/1 出血1/1
			CNV: 角膜新生血管, IR: 虹彩			
			各所見を呈した眼数/検査眼数			

強度照射

			レーザー照射から観察までの期間			
			3時間	3日	1週	2週
ポルフィマー ナトリウム静注 からレーザー 照射までの時間 (時間)	24	CNV	閉塞8/8	閉塞6/6	再発1/3	再発1/2
		IR	漏出1/8 閉塞7/8	閉塞6/6 出血6/6 前房出血?	閉塞3/3 出血3/3	閉塞2/2 出血2/2
	48	CNV	閉塞6/6	閉塞4/4	再発3/3	再発2/2
		IR	漏出1/6 閉塞5/6	閉塞4/4 出血2/4	閉塞3/3 出血2/3	再疎通2/2
	72	CNV	閉塞6/6	閉塞5/5	再発2/3	再発2/2
		IR	漏出4/6 閉塞2/6	閉塞5/5 出血3/5	閉塞3/3 出血3/3	再疎通2/2
	96	CNV	閉塞5/5	閉塞4/4	再発3/3	再発1/1
		IR	漏出1/5 閉塞4/5	閉塞4/4 出血4/4	閉塞3/3 出血3/3	漏出1/1
			CNV: 角膜新生血管, IR: 虹彩			
			各所見を呈した眼数/検査眼数

図18 アルゴン緑レーザー照射のみを行った対照眼の蛍光造影写真。(造影開始13秒)

新生血管には色素流入が認められる。

IV 考 察

本年、本邦において一部の悪性腫瘍にはあるが、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン注[®]）の人体投与が認可された。これにより今後の適応拡大も期待できるので、我々は本物質を使用した実験を行った。なお、他にローズベンガルが人体投与を認められており、眼科領域での基礎的報告もあるが^{(8)・(14)・(17)・(20)}、光化学作用自体が弱いともいわれ、今後検討を要する。

ポルフィマーナトリウムは400nm前後の近紫外域に強い吸収帯と500～600nmにかけた可視域に吸収帯を持つ。近紫外光は発癌性や水晶体での吸収⁽²⁶⁾、視細胞に対する障害作用⁽²⁷⁾が指摘されていることから、光化学治療の励起光には適さないと考えられる。悪性腫瘍治療には皮膚や腫瘍深部への透過性の有利な630nmエキシマ色素レーザーが使用されるが^{(28)・(29)}、眼球では緑色光でも十分に透過可能であり、しかも緑色光が吸収スペクトル上赤色光より吸収がよいこと、眼科臨床でアルゴン緑レーザー（514nm）は汎用されており、臨床応用の際に高価なレーザー装置の購入が不要なことからアルゴン緑レーザーを励起光とした。

異なる病態において角膜、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、観察も容易な角膜新生血管を実験モデルに使用した。実験的角膜新生血管作成方法はb-FGF含有ペレット包埋法⁽²⁵⁾以外に、角膜通条法⁽⁸⁾、インターロイキン2包埋法⁽³⁰⁾などが報告されているが、新生血管増殖抑制物質

の開発等で十分な検討がなされているペレット包埋法を選んだ。予備的に調べたペレット包埋法の経過では、ペレット包埋1週前後に角膜輪部からペレットに達するやや密な新生血管が生じ、その後新生血管はやや疎となって、包埋2週以降はほとんど変化なく約2か月間存在し、その後徐々に消退した。実験には包埋2週後の増殖の安定した時期を新生血管モデルとして使用した。

光化学治療後に細隙灯検査で新生血管が暗赤色で血流がみられず、蛍光造影検査でも色素流入がない場合、新生血管の閉塞とした。光顕標本では管腔壁の血栓付着、管腔内の赤血球充満がみられた。しかし、血管壁の詳細な形態学的変化は光顕的観察では限界がある。今回光顕で観察した標本の一部を透過型電顕で観察したところ、血管内皮細胞、壁細胞の変性やところにより内皮細胞の脱落がみられ、血栓形成の生じている所見が得られているが（未発表結果）、今後さらに検討が必要である。

また、照射出力が小さいことと、対照実験でまったく変化がなかったことから、今回の治療効果はレーザーの熱作用ではなく、ポルフィマーナトリウムとアルゴンレーザー相互の光化学反応によるものと考えた。

ポルフィマーナトリウム静注からレーザー照射までの時間については、悪性腫瘍治療における報告を参考にした^{(24)・(28)・(29)}。悪性腫瘍治療では静注48～72時間後が最適時期とされるので、今回は24～96時間後の間の4時点において、いつが新生血管治療に適するかを検討した。その結果、弱度照射ではポルフィマーナトリウム静注24～72時間後に照射を行えば、新生血管の閉塞が得られ、しかも虹彩など新生血管周囲の組織障害も可逆性であることが解った。中等度照射では24～72時間後の照射にて新生血管閉塞が得られ、角膜混濁、結膜浮腫、虹彩血管閉塞も一過性であったが、眼底血管への影響と新生血管の再発が問題であった。眼底の障害は瞳孔およびメラニン色素をもたない虹彩を透過した照射光により、脈絡膜血管が光化学作用で閉塞されたものと推測される。強度照射では24～96時間後のいずれの照射でも全例新生血管は閉塞したが、1週後に新生血管の激しい再発がみられ、また、照射野の虹彩血管の閉塞と、その周囲血管の血液眼槽の破綻、虹彩出血、前房出血が生じた。角膜混濁や眼底の障害も強いことから、新生血管治療には過剰照射と考えられた。

治療1週後の新生血管再発の原因としては、まず、ペレット内に残存したb-FGFによる影響が考えられる。しかし、残存b-FGFによる作用のみが再発原因なら、照射強度の違いにより再発の程度が異なることが説明できない。弱度照射での再発はごく軽度だが、中等度、強

度照射の再発は激しかった。この理由として、照射野の虹彩血管の柵機能障害による前房内炎症の影響が考えられる。眼内の炎症により角膜新生血管が生じることは他にも報告されている³¹⁾。また、虹彩血管、脈絡膜血管の閉塞による血管増殖促進因子放出の可能性も考えられる。これらの要因は虹彩、眼底の障害が強い眼ほど激しい再発を来したものと合致する。その他、ペレット基材がレーザー照射を受けて変性し、それが刺激性を持ったり、基材の変性によりb-FGFが多量に放出されたために激しい再発が生じた可能性も考えられる。これらの可能性も照射強度が強いもので再発が激しいことに合致するので、再発原因についてはさらに検討が必要である。

虹彩や眼底等の新生血管以外の正常組織にも障害が生じたことは、新生血管の選択的治療という点から問題である。理論的にはポルフィマーナトリウムの増殖組織集積性が高く、新生血管のみに集積するなら、正常組織を障害することなく新生血管のみを選択的に閉塞できるはずである。しかし、実際にはいずれの治療条件でも正常組織の障害を完全に抑えることはできず、ポルフィマーナトリウムに完全な選択性は期待できない。したがって、虹彩など周囲組織の障害が軽度で可逆的である弱度照射をポルフィマーナトリウム静注24~72時間後に行うのが、実験的角膜新生血管モデルの治療に適しているといえる。また、正常組織への影響をより小さくする方法として、レーザーの照射方法の改善がある。たとえば今回のように角膜に対して垂直に照射するのではなく、接線方向に照射することで虹彩等への照射をさける方法であるが、これについては今後検討予定である。ところで、この新生血管治療に適した照射強度は悪性腫瘍治療に使用される照射強度^{24), 28), 29)}に比べてかなり弱かった。一般的に悪性腫瘍治療には今回の強度照射程度が行われるが、それに比べると角膜新生血管治療には1/8の照射エネルギーでよいことになる。これは腫瘍が厚みを有するためレーザー光が腫瘍深部まで到達する必要があること、体積が大きいのにに対し、新生血管の体積は小さく、しかも透明な角膜内にあることからレーザー光を遮るものがなく、腫瘍より効率よくレーザー光が作用することが主な要因と思われる。

角膜新生血管はそれ自体が視力障害を来すのみでなく、角膜移植の成否に影響を与える因子であり^{32), 33)}、その治療は重要である^{8), 34)}。ポルフィマーナトリウムを使用した光化学治療は新生血管のみを選択的に閉塞することはできないが、照射条件、照射方法の工夫により周囲組織の障害を許容範囲内に抑えて、角膜新生血管の新しい治療方法のひとつになり得ると思われ、さらに眼底

に生じる網膜前、網膜下新生血管などへの応用も期待される。

V 結 語

ポルフィマーナトリウムとアルゴン緑レーザーによる実験的角膜新生血管の光化学治療において、適正な治療条件を検討した。光化学治療は悪性腫瘍の治療のみならず、眼内新生血管の閉塞治療にも有効であることが解った。

謝 辞

徐放性ペレット基材に使用したEVAは武田薬品工業 須藤勝一博士の御好意により提供を頂いた。ポルフィマーナトリウム（フォトフリン注[®]）は日本レダリー株式会社から御提供頂いた。ここに謹んで謝意を表します。

本論文の内容の一部は第59回日本中部眼科学会（1993年松江）、第48回日本臨床眼科学会専門別研究会（レーザー眼科学、1994年千葉）、第99回日本眼科学会総会（1995年名古屋）に於いて発表した。

文 献

- 1) Lipson RL, Bl ades EJ : The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch Dermatol 82 : 508-516, 1960.
- 2) Dougherty TJ, Gindey GB, Fiel R, Boyle DG : Photoradiation therapy. II Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J Natl Cancer Inst 55 : 115-119, 1975.
- 3) 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.
- 4) Star WM, Marijnissen JPA, Van Den Berg-Block AE, Reinhold HS : Destructive effect of photoradiation on the microcirculation of a rat mamary tumor grouing in 'sandwich' observation chanbers. Progress in Clinical and Biological Research, 170. In : Doiren DR, et al (Eds), 637-645 Alan R Liss : New York, 1984.
- 5) Sel man SH, Kreimer-Birnbaum M, Kl aunig 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.
- 6) Ber enbaum MC, Hall GW, Hoyes AD : Cere-

bral photosensitization by haematoporphyrin derivative. Evidence for an endothelial site of action.

Br J Cancer 53 : 81-89, 1986.

- 7) Orenstein A, Nelson JS, Liaw L-HL, Kaplan R, Kimel S, Berns MW : Photochemotherapy of hyper vascular dermal lesions : A possible alternative to photothermal therapy? Lasers in Surg and Med 10 : 334-343, 1990.
- 8) Corrent G, Roussel TJ, Tseng SCG, Watson BD : Promotion of graft survival by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization. Arch Ophthalmol 107 : 1501-1506, 1989.
- 9) Epstein RJ, Hendricks RL, Harris DM : Photodynamic therapy for corneal neovascularization. Cornea 10 : 424-432, 1991.
- 10) Pallikaris IG, Tslimbaris MK : Effectiveness of corneal neovascularization photothrombosis using phthalocyanine and a diode laser (675 nm). Lasers in Surg and Med 13 : 197-203, 1993.
- 11) Tslimbaris MK, Pallikaris IG, Naoumide II, Vlahonikolis IG, Tsakalof AK, Lydataki SE : Phthalocyanine mediated photodynamic thrombosis of experimental corneal neovascularization : Effect of Phthalocyanine dose and irradiation onset time on vascular occlusion rate. Lasers in Surg and Med 15 : 19-31, 1994.
- 12) Packer AJ, Tse DT, Gu X-Q, Hayreh SS : Hematoporphyrin photoradiation therapy for iris neovascularization. A preliminary report. Arch Ophthalmol 102 : 1193-1197, 1984.
- 13) Miller JW, Stinson WG, Gregory WA, Elkoumy HA, Puliafito CA : Phthalocyanine photodynamic therapy of experimental iris neovascularization. Ophthalmology 98 : 1711-1719, 1991.
- 14) Royster AJ, Nanda SK, Hatchell DL, Tiedeman JS, Dutton JJ, Hatchell MC : Photochemical inhibition of thrombosis. Fluorescein angiographic, histologic, and ultrastructural alterations in the choroid, retinal pigment epithelium, and retina. Arch Ophthalmol 106 : 1608-1614, 1988.
- 15) Wilson CA, Hatchell DL : Photodynamic retinal thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion. Invest Ophthalmol Vis Sci 32 : 2357-2365, 1991.
- 16) Buechi ER, Lam TT, Suvaizidis I, Tso MOM : Injuries induced by diffuse photodynamic action in retina and choroid of albino rats. Morphological study of experimental model. Retina 14 : 370-378, 1994.
- 17) Wilson CA, Saloupis P, Hatchell DL : Treatment of experimental preretinal neovascularization using photodynamic thrombosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 32 : 2530-2535, 1991.
- 18) Lin SC, Lin CP, Feld JR, Duker JS, Puliafito CA : The photodynamic occlusion of choroidal vessels using benzoporphyrinderivative. Curr Eye Res 13 : 513-522, 1994.
- 19) 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.
- 20) Miller H, Miller B : Photodynamic therapy of subretinal neovascularization in the monkey eye. Arch Ophthalmol 111 : 855-860, 1993.
- 21) Kliman GH, Puliafito CA, Stern D, Borirakchanavatt S, Gregory WA : Phthalocyanine photodynamic therapy : New strategy for closure of choroidal neovascularization. Lasers in Surg and Med 15 : 2-10, 1994.
- 22) Hayata Y, Kato H, Konaka C, Takizawa N : Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. Chest 81 : 269-277, 1982.
- 23) Hayata Y, Kato H, Konaka C : Photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative in early and stage I lung cancer. Chest 86 : 169-177, 1984.
- 24) 加藤治文 : 光感受性物質を用いたレーザー光線による癌の診断と治療. 小黒八七郎 : 癌治療におけるレーザー医学. 医学図書, 東京, 203-212, 1991.
- 25) 須藤勝一, 藤田 剛 : 血管新生とその制御 - 薬剤開発の立場から. 眼紀40:1431-1443, 1989.
- 26) 寺田久雄, 澤 充, 秋葉 純, Norio Ueno, Bireswar Chakrabarti : 正常ヒト水晶体光透過特性. 日眼会誌98:1101-1108, 1994.
- 27) Sliney DH : Interaction mechanism of laser

radiation with ocular tissue. *Lasers and Light in Ophthalmol* 2:122-128, 1988.

- 28) 小野良祐, 池田茂人: 肺癌に対する光科学治療. 小黒八七郎: 癌治療におけるレーザー医学. 医学図書, 東京, 213-228, 1991.
- 29) 三村征四郎, 一居 誠, 奥田 茂: 上部消化器癌に対する光化学治療. 小黒八七郎: 癌治療におけるレーザー医学. 医学図書, 東京, 229-238, 1991.
- 30) Epstein RJ, Hendricks RL, Stulting RD: Interleukin-2 induces corneal neovascularization in A/J mice. *Cornea* 9: 318-323, 1990.
- 31) Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM: Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea* 6: 250-257, 1987.
- 32) Maguire MG, Stark WJ, Gottsch, JD, Stulting RD, Sugar A, Fink NE, et al: Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. *Ophthalmology* 101: 1536-1547, 1994.
- 33) 山上 聡, 鈴木康之, 大矢智博, 宮田和典, 水流忠彦: 全層角膜移植術の拒絶反応発生因子の多変量解析による検討. *日眼会誌*98:1097-1100, 1994.
- 34) Baer JC, Foster CS: Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser. *Ophthalmology* 99: 173-179, 1992.