

# 緑内障濾過手術眼のテノン囊および上強膜切除組織に対する 放射線 ( $\beta$ 線) 照射の効果 (図5, 表2)

真野 富也・大橋 裕一・梅本 真代 (関西労災病院眼科)  
檀 上 真次・真 鍋 禮 三 (大阪大学医学部眼科学教室)  
真 崎 規 江 (大阪大学医学部放射線医学教室)

## The Effect of Beta-ray Irradiation on the Growth of Subconjunctival Fibroblasts in Tissue Culture

Tomiya Mano, Yuichi Ohashi, Masayo Umemoto<sup>1)</sup>,  
Shinji Danjo, Reizo Manabe<sup>2)</sup> and Norie Masaki<sup>3)</sup>

1) Division of Ophthalmology, Kansai Rosai Hospital

2) Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

3) Department of Radiology, Osaka University Medical School

### 要 約

緑内障濾過手術後の結膜下癒痕形成に関係する線維芽細胞に対する  $\beta$  線照射による増殖抑制効果について *in vitro* で検討した。緑内障患者より手術時に上強膜とテノン囊を採取して初代培養を行い  $\beta$  線照射の影響を調べた。その結果、緑内障濾過手術後の結膜下癒痕形成には上強膜線維芽細胞よりもテノン囊線維芽細胞の方がより強く関係していた。また、 $\beta$  線照射によりテノン囊線維芽細胞の増殖は抑制され、10Gy で線維芽細胞の増殖率は非照射群の約20%、15Gy では約10%に増殖が抑制された。20Gy および30Gy の線量でも増殖率は約10%で、15Gy 群と変わらなかったが、細胞質、核の変化がより強く認められた。*In vitro* でテノン囊線維芽細胞の増殖を抑制するには、少なくとも15Gyが必要であると考えられる。臨床的に緑内障術後の結膜下癒痕形成を抑制する手段として  $\beta$  線照射は有効であると思われる。(日眼 91 : 694—698, 1987)

キーワード :  $\beta$  線, 結膜下線維芽細胞, 初代培養, 緑内障, 濾過手術

### Abstract

Inhibiting subconjunctival fibroblast proliferation and maintaining filtering blebs are essential to control IOP after glaucoma filtering surgery. We investigated subconjunctival fibroblast growth and their inhibition by means of Sr-90 beta irradiation in tissue culture. Small specimens of Tenon's capsule and episclera which were obtained after trabeculectomy in cases of glaucoma were cultured in the MEM medium. Fibroblasts from a Tenon's capsule were divided into 5 groups and each group was irradiated with a dose of 5, 10, 15, 20 or 30Gy of betaray using an Sr-90 ophthalmic applicator. These were cultured for 21 days after irradiation and the growing fractions of each group were measured and compared with nonirradiated controls. The growing fractions of these were 26%, 18%, 11%, 12% and 14% after 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy and 30Gy of beta-irradiation, respectively. A dose of at least 15Gy was required to inhibit grow of the fibroblasts from Tenon's capsule. These results suggested that the clinical use of beta irradiation inhibited subconjunctival scarring effectively after glaucoma filtering surgery. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 694—698, 1987)

別刷請求先 : 660 尼崎市稲葉荘 3丁目-1-69 関西労災病院眼科 真野 富也

Reprint requests to : Tomiya Mano M.D.

3-1-69 Inabaso, Amagasaki City 660, Japan

(昭和62年2月24日受付) (Accepted February 24, 1987)

Key words : beta irradiation, subconjunctival fibroblast, tissue culture, glaucoma, filtering surgery

### I 緒 言

緑内障濾過手術眼においては、術後の結膜下癒痕形成を抑制し濾過泡を持続させることは長期の眼圧コントロールを得るために重要である。これまで、結膜下癒痕形成を抑制する手段として、steroidの全身<sup>1)</sup>および局所投与<sup>2)</sup>や5-Fluorourasil (5-FU)の局所投与<sup>3)</sup>さらに抗prostaglandin剤の局所投与<sup>4)</sup>などが行われている。しかし、steroidの全身および局所投与には全身的副作用だけでなく、白内障の併発さらには眼圧上昇をきたす副作用が報告されている<sup>1)</sup>。また、5-FUの局所投与では遷延性角膜上皮欠損が高頻度でみられ、薬剤の眼内および全身への移行による副作用の危険もある<sup>3)</sup>。そこで、こうした癒痕形成を抑制する手段としてβ線照射を難治性緑内障の術後に試みたところ好結果が得られた<sup>5)</sup>。しかし、実際の臨床応用のためには線維芽細胞の増殖抑制に必要なβ線の線量を検討することが必要である。今回、緑内障手術時に術野より切除したテノン囊および上強膜について初代培養を行い、β線照射がこれらの線維芽細胞の増殖に及ぼす影響について検討した。

### II 実験材料および方法

#### 1. テノン囊および上強膜線維芽細胞の初代培養

難治性の緑内障患者6例、6眼よりテノン囊と上強膜を切除した。上強膜の切除は約10×10mmの範囲を十分二極式凝固器で止血したのちゴルフメスにて強膜の約1/4層の厚さで行った。その後、直ちに切除したテノン囊と上強膜をEagle minimal essential medium (MEM) 培養液の入った試験管に入れ37℃のincubatorで1時間静置した。その後、切除片をMEMで数回洗浄し付着血液を除去した後、約1×1mmに細切した。各細切組織を直径6cmのplastic culture dish (Falcon社製)に1個ずつ入れ、15%胎児牛血清(FCS)入りMEM培養液を用いて初代培養を行った。

#### 2. β線照射によるテノン囊線維芽細胞の増殖抑制

緑内障と網膜剝離手術時にテノン囊を採取し、MEM培養液で付着血液を洗浄した。その後、採取したテノン囊を5等分に分割し、MEM培養液の入った直径6cmのculture dish (Falcon社製)に入れた。β線照射は、Sr-90眼科用アプリケーションを使用し、それぞれ5Gy (1Gy=100rad), 10Gy, 15Gyと20Gy (一部30

Gy)と4群に行い、コントロールを非照射群とした。その後、各群の組織をさらに5ないし6個の小片、約1×1mm)に細切し、15%FCS入りMEM培養液で初代培養を行った(図1)。

21日間培養後、100%メタノールで固定し、ギムザ染色を行い、各culture dishを写真撮影し、コンピューターを用いて線維芽細胞の増殖した面積、すなわち、

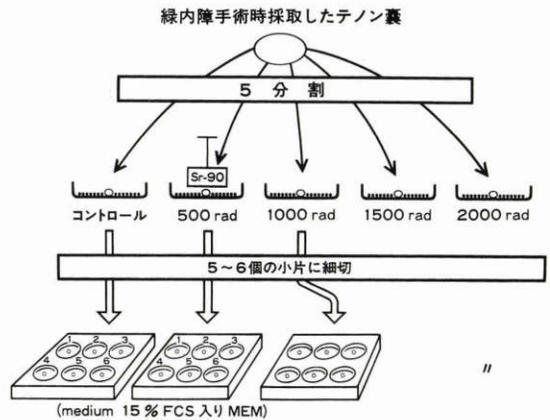


図1 実験方法

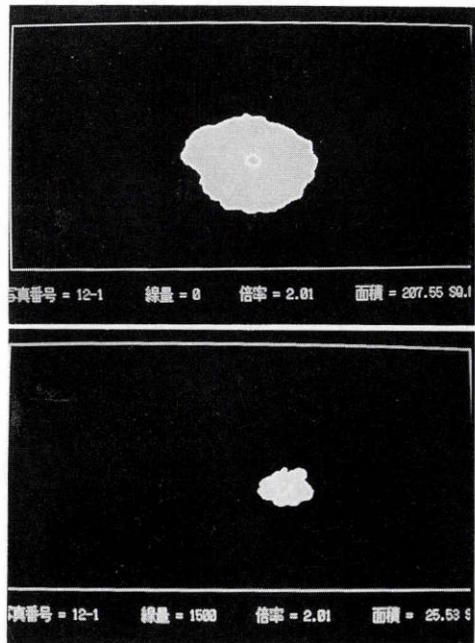


図2 細胞増殖率の算出法(細胞増殖面積からexplantの面積を減じた.)

細胞増殖部分より explant の面積を減じたものを計算した(図2)。そして、コントロールの非照射群を100%とした時の各β線照射群の細胞増殖面積率を計算した。

### III 結 果

#### 1. テノン嚢および上強膜線維芽細胞の初代培養

テノン嚢は6眼すべてで培養1週目から線維芽細胞の増殖が認められ、培養2週目では強い線維芽細胞の増殖がみられた。一方、上強膜は2週間経過しても線維芽細胞の増殖はまったくみられなかった(表1)。図3(a, b)の写真は100%メタノールで固定後、ギムザ染色を行った直径6cmのculture dishをそのまま撮影したものである。図3(a)は培養2週目のテノン嚢で explant の周囲に渦状に増殖した線維芽細胞がみられる。これに対して図3(b)は上強膜の培養2週目のもので explant の周囲には線維芽細胞の増殖はまったく見られない。

#### 2. β線照射によるテノン嚢線維芽細胞の増殖率

β線5Gy (1Gy=100rad)照射によりテノン嚢の線維

表1 テノン嚢および上強膜の初代培養の結果

|      | 標本数 | 培養1週目<br>細胞増殖出現 | 培養2週目<br>渦状に活動性高く細胞増殖 |
|------|-----|-----------------|-----------------------|
| テノン嚢 | 6   | 6 / 6           | 6 / 6                 |
| 上強膜  | 6   | 0 / 6           | 0 / 6                 |

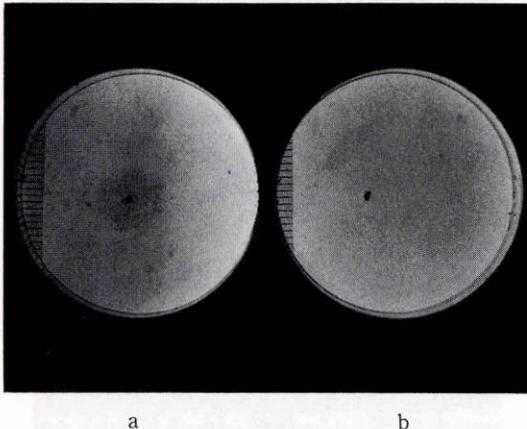


図3 テノン嚢および上強膜の初代培養で培養後2週目の写真

(a)はテノン嚢、(b)は上強膜である。

芽細胞の増殖は平均でコントロールの非照射群の25.6%であり、10Gyでは18.5%、15Gyでは11.2%でありさらに20Gyでは12.1%、30Gyでは13.8%であった。15Gy以上の線量では20Gyでも30Gyでも線維芽細胞増殖率は同程度であった(図4、表2)。

また、β線照射により増殖した線維芽細胞は細胞質、核ともにコントロールとくらべて著明に膨化し、巨細胞化していた。図5の写真は21日間培養後固定しギムザ染色を行ったものを20倍の撮影倍率で写真撮影したものである。図5(a)はコントロールのもので、monolayerで緻密に線維芽細胞が増殖していた。これに対して図5(b)はβ線を15Gy照射したもので線維芽細胞は大きく、核も著明に膨化しており、単位面積当たりの細胞数はコントロールとくらべて著明に減少し

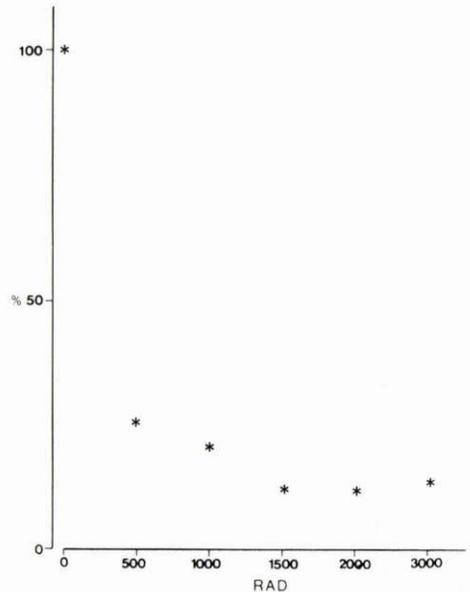


図4 β線の照射線量とテノン嚢線維芽細胞増殖率との関係

表2 β線照射線量とテノン嚢線維芽細胞増殖率との関係

| 線量 (Gy)<br>1Gy=100rad | 標本数 | 細胞増殖率 (%) | 細胞増殖容積平均 (ml) | 標準偏差 (SD) |
|-----------------------|-----|-----------|---------------|-----------|
| 0                     | 47  | 100       | 65.62         | 48.91     |
| 5                     | 14  | 25.57     | 16.78         | 8.46      |
| 10                    | 49  | 18.49     | 12.13         | 12.75     |
| 15                    | 41  | 11.17     | 7.33          | 5.28      |
| 20                    | 44  | 12.12     | 7.95          | 6.03      |
| 30                    | 13  | 13.94     | 9.15          | 9.33      |

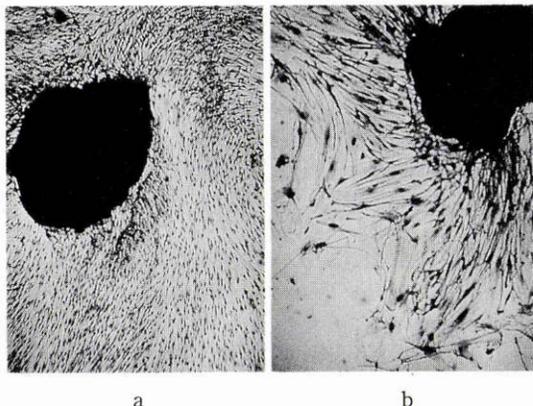


図5 テノン嚢初代培養後21日目の写真(ギムザ染色,  $\times 20$ )  
(a)はコントロール, (b)は $\beta$ 線15Gy (1,500rad)照射したもの。

ていた。20Gy, 30Gyの線量では増殖率にはあまり差が見られなかったが、増殖した線維芽細胞の細胞質と核の変化は15Gy照射群に比し高度であった。

#### IV 考 按

現在、緑内障眼に対する手術には種々の術式があるが、trabecular meshwork から Schlemm 氏管への conventional な房水流出経路からの房水排出が望めない緑内障眼では、結膜下への濾過手術を行う以外眼圧を下げる有効な方法がない。こうした濾過手術の代表的術式が trabeculectomy である。しかし、trabeculectomy は、50歳以下の若年者<sup>9)</sup>や無水晶体眼<sup>9)</sup>、また過去に眼の手術の既往のあるものなどでは極めて成功率が悪い<sup>3)</sup>。

Trabeculectomy の失敗の原因には、1) 線維柱帯切除部への虹彩や硝子体の嵌入あるいは線維性膜形成による閉塞、2) Schlemm 氏管の断端の閉塞、3) 強膜弁下での閉塞、4) 結膜下組織の癒痕形成などによる房水流出障害が考えられる。特に、若年者や手術の既往眼での失敗の原因は結膜下組織の癒痕形成すなわち強膜弁縫合部からテノン嚢での癒痕形成が早くかつ強くおこるためと考えられている。このように、trabeculectomy の長期予後を考えると決して満足のものではなかった<sup>7)</sup>。

こうした結膜下の癒痕形成を抑制するために、これまで、ステロイドの全身ならびに局所投与や5-FUの局所投与等が行われている<sup>1)~3)</sup>。ステロイドの投与は創傷部での炎症反応を抑制するとともに、創傷部基質

における酸性ムコ多糖の減少による線維芽細胞が産生する tropocollagen の重合が阻害されるために collagen 線維の形成が妨げられ、癒痕形成が抑制されると考えられている。一方、ピリミジン拮抗性抗腫瘍剤である5-FUの投与は線維芽細胞のDNA前駆体の合成を阻害し、細胞増殖を抑制する。著者らは $\beta$ 線照射もこうした結膜下癒痕形成を抑制する手段として効果のあることは、緑内障術後例について前回報告した<sup>5)</sup>。また、これまで細隙灯顕微鏡で見ると、 $\beta$ 線照射による副作用は経験していない。また、1970年にCameronも難治性の緑内障に手術を行い $\beta$ 線照射を併用している<sup>10)</sup>。 $\beta$ 線照射は翼状片術後の再発防止に従来より使用されており、その有効性と安全性について確かめられている<sup>8)</sup>。 $\beta$ 線源は Strontium 90眼科用アプリケーションが使用され、これから放出される $\beta$ 線は、最大エネルギー0.5MeVの低エネルギーであるが、その崩壊過程にある Y-90が2.3MeVの $\beta$ 線を放出しこれが治療に用いられている。Sr-90眼科用アプリケーションからの $\beta$ 線は組織透過性が弱く、深さ約3mmで20%以下、4mmで10%以下となり、水晶体や網膜への障害の危険性はほとんどない。

さて、これまで trabeculectomy 失敗の原因の一つである結膜下の癒痕形成は主として上強膜の組織による癒痕形成と考えられていたが、今回の実験結果より上強膜の線維芽細胞の増殖は非常に少なく、あっても極めて遅いものと考えられる。これに対して、テノン嚢の線維芽細胞は *in vitro* で増殖は強く起ることが確かめられた。このことから trabeculectomy の強膜弁での創傷治療には上強膜の線維芽細胞よりもテノン嚢の線維芽細胞の方がより強く関係しているものと思われる。この他、trabeculectomy の強膜弁での創傷治療に関係していると思われるものに上強膜の血管由来の内皮細胞や macrophage、リンパ球由来細胞などが考えられるが、今後、これらの点についても検討する必要がある。

今回は採取したテノン嚢に対する $\beta$ 線照射の影響を調べたが、テノン嚢の線維芽細胞の増殖は $\beta$ 線照射により抑制された。すなわち、術後の癒痕形成に関係する線維芽細胞の増殖抑制に $\beta$ 線照射が有効であることは明らかであるが、目的に応じた適正な照射線量、年代別照射線量、線量分割の方法、手術後の照射時期などについてもさらに検討する必要がある。今回の結果からは、緑内障術後のテノン嚢線維芽細胞の増殖を抑制するには15Gyが妥当な線量であると考えられ

る。

## 文 献

- 1) **Starita RJ, Fellman RL, Spaeth GL**: Short- and long-term effects of postoperative corticosteroids on trabeculectomy. *Ophthalmology* 92: 938—946, 1985.
- 2) **Giangiacomo J, Dueker D, Adelstein EH**: The effect of preoperative subconjunctival triamcinolone administration on glaucoma filtration. *Arch Ophthalmol* 104: 838—841, 1986.
- 3) **Heuer DK, Parris RK II, Gressel MG, et al**: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. *Ophthalmology* 91: 384—393, 1984.
- 4) **Migdal C, Hitchings R**: Developing bleb; effect of topical antiprostaglandins on the outcome of the glaucoma fistulizing surgery. *Br J Ophthalmol* 67: 655—660, 1983
- 5) **真野富也, 真鍋禮三, 真崎規江**他: 緑内障手術眼への放射線 ( $\beta$ 線) 照射の試み. *眼臨* 80: 2145—2148, 1986.
- 6) **Heuer DK, Gressel MG, Parrish RK, et al**: Trabeculectomy in aphakic eyes. *Ophthalmology* 91: 1045—1051, 1984.
- 7) **Inaba Z**: Long-term results of trabeculectomy in the Japanese: An analysis by life-table method. *Jpn J Ophthalmol* 26: 361—373, 1982.
- 8) **Van den Brenk HAS**: Result of prophylactic postoperative irradiation in 1300 cases of pterygium. *Am J Roentgenol* 103: 723—733, 1968.
- 9) **Gressel MG, Heuer DK, Parrish RK II**: Trabeculectomy in young patients. *Ophthalmology* 91: 1242—1246, 1984.
- 10) **Cameron ME**: Beta irradiation as an adjunct to surgery in refractory glaucoma. *Trans Aust Coll Ophthalmol* 2: 53—60, 1970.

(第90回日眼総会原著)