

## 正常家兎眼におけるステロイド剤硝子体内投与による網膜毒性の検討

瓶井 資弘<sup>1)</sup>, 田野 保雄<sup>2)</sup>, 酒井 宏之<sup>3)</sup>, 中澤 文雄<sup>3)</sup>, 白澤 榮一<sup>3)</sup>, 石井 康雄<sup>4)</sup><sup>1)</sup>国立大阪病院眼科, <sup>2)</sup>大阪大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup>参天製薬株式会社中央研究所, <sup>4)</sup>白内障研究所

## 要 約

正常家兎眼を用いてステロイド剤の硝子体内投与による網膜への影響と副作用の検討を行った。フルオロメトロンとテトラヒドロコルチゾールの2種類のステロイド剤を用い、生理食塩水に溶解し20 mg/mlに調整したのち0.05 mlを硝子体内に注入した。同量の生理食塩水を注入したものを対照とした。各々につき検眼鏡的検査、眼圧測定、ERG測定および光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織学的検索を行った。その結果、ステロイド剤注入群は肉眼的にも組織学的にも対照群と比較して変化はなく、検査値にも統計学的に有意差はなかった。よって、硝子体内投与されたこれら2種類のステロイド剤は今回の濃度および投与量であれば網膜毒性は示さず、眼圧上昇も来さないと判断された。(日眼会誌 96:1253-1260, 1992)

キーワード: ステロイド剤, 硝子体内投与, 網膜毒性, 眼圧, 家兎

## Retinal Toxicity of Intravitreally Injected Steroids on the Rabbit Eye

Motohiro Kamei<sup>1)</sup>, Yasuo Tano<sup>2)</sup>, Hiroyuki Sakai<sup>3)</sup>,Fumio Nakazawa<sup>3)</sup>, Eiichi Shirasawa<sup>3)</sup> and Yasuo Ishii<sup>4)</sup><sup>1)</sup>Eye Clinic, Osaka National Hospital<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School<sup>3)</sup>Central Research Laboratories, Santen Pharmaceutical Company Limited<sup>4)</sup>Eye Institute of the Cataract Foundation

## Abstract

The retinal toxicity of intravitreally injected steroids, fluorometholone and tetrahydrocortisol, was examined. The concentration of the steroids was 20 mg/ml, and 0.05 ml of each solution were injected into the rabbit vitreous cavity. An equal volume of saline solution was injected as a control. In addition to ophthalmoscopy, intraocular pressure was measured and electroretinography, light microscopy and electron microscopy were performed. The results showed no remarkable changes in all eyes. Fluorometholone and tetrahydrocortisol seem to have neither toxicity to the retina nor adverse effect of elevating intraocular pressure when intravitreally injected with this amount. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1253-1260, 1992)

Key words: Steroids, Intravitreally injection, Retinal toxicity, Intraocular pressure, Rabbit

別刷請求先: 540 大阪市中央区法円坂2-1-14 国立大阪病院眼科 瓶井 資弘

(平成4年1月31日受付, 平成4年4月17日改訂受理)

Reprint requests to: Motohiro Kamei, M.D. Eye Clinic, Osaka National Hospital, 2-1-14 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan

(Received January 31, 1992 and accepted in revised form April 17, 1992)

## I 緒 言

一旦復位を得た裂孔原性網膜剥離や穿孔性眼外傷の術後併発症のうち、時に治療に難渋するものに裂孔周囲の増殖膜形成や増殖性硝子体網膜症の発生がある。その発生抑制は網膜復位術における大きな課題であり、解決策の1つとしてステロイド剤の硝子体内投与が検討されてきた。その有効性に関しては、眼内投与された線維芽細胞の増殖がデキサメサゾンやトリアムシノロンの硝子体内投与により抑制されることを示した動物実験<sup>1)~3)</sup>や、家兎の硝子体手術において灌流液中にデキサメサゾンを用い消炎効果があったとする報告<sup>4)</sup>があり、その効果は全身投与より硝子体内投与のほうが大きいと報告されている<sup>5)</sup>。毒性に関しては、家兎硝子体内に投与し網膜毒性がなかったとする報告<sup>6)7)</sup>や高濃度では網膜障害を認めたとの報告<sup>8)</sup>、および市販ステロイド剤の溶媒についての網膜毒性報告<sup>9)</sup>がある。また、最近では血管新生を抑制する薬剤として antiangiogenic steroid が注目されており<sup>10)</sup>、各種ステロイド剤の毒性が検討されつつある。しかし、これらの研究にもかかわらず現在のところ未だ臨床応用は成されていない。

そこで我々は臨床に上期待されるフルオロメトロンとテトラヒドロコルチゾールの2種類のステロイド剤を用いて、硝子体内投与による網膜毒性を検眼鏡的、組織学および電気生理学的に検討し、加えて副作用として考えられる眼圧に及ぼす影響についても検討したので報告する。

## II 方 法

フルオロメトロン(フルメトロン<sup>®</sup>参天製薬社製)とテトラヒドロコルチゾール(シグマ社製)の2種類のステロイド剤を用いて行った。原末を使用直前にクリーンベンチ内で滅菌生理食塩水(大塚製薬社製)に溶解し、20 mg/ml の濃度に調整した。両者とも難水溶性であり、得られた溶液は懸濁液であった。

体重2.5~3.0 kg の日本白色雄家兎を用い、ミドリンP<sup>®</sup>で散瞳し、0.4%塩酸オキシプロカイン(ペノキシール<sup>®</sup>)の点眼による表面麻酔を施した。薬剤投与前に倒像鏡による眼底検査と眼底写真撮影および眼圧の測定を行った。眼球マッサージにて眼圧を下降させた後、耳上側角膜輪部の3 mm 後方より27 G 針にて硝子体腔内へ刺入し、各々の薬剤0.05 ml をゆっくりと注入した。注入直後に倒像鏡による眼底検査を行い、

注入による合併症を除外し、また注入直後の眼底写真撮影を行った。同様にして生理食塩水0.05 ml を注入したものを対照群とした。各群とも他眼には何も注入せず無処置対照群とした。

全眼とも処置直前・直後、処置後24時間、3日、7日、14日、21日、28日に倒像鏡による眼底検査、眼底写真撮影を行った。眼圧測定は処置日および処置後24時間、7日、14日、28日に、ERGの測定は処置前日および処置後3日、7日、14日、28日に行った。なお、眼圧測定にはAlcon Applanation Pneumatograph<sup>®</sup>を用いた。

今回のERG測定は点眼麻酔のみで行った。暗室内で2時間の暗順応を施したのち、ミドリンP<sup>®</sup>で散瞳した。散瞳後シールドボックス内に無麻酔下に保定し、0.4%塩酸オキシプロカイン(ペノキシール<sup>®</sup>)の点眼による表面麻酔および1%コンドロイチン硫酸ナトリウム(1%コンドロ<sup>®</sup>)の点眼を施したのち、角膜上にコンタクトレンズ電極(京都コンタクトレンズ社製)を装着した。不関電極は両耳間の中央部に設置した。光刺激には三双製作所製ERG用光刺激装置を用い、角膜面より1 cm の位置に光ファイバー先端を設置し、角膜面照度3,000 Lux、刺激持続時間200 msecの白色刺激光を単発照射した。誘発して得られた波形は時定数を0.3および0.03 secとし、1 kHzでhigh cut offした生体電気用増幅ユニット4124<sup>®</sup>(日本電気三栄社製)で増幅後、シグナルプロセッサ7T08<sup>®</sup>(日本電気三栄社製)を介してコンピューターPC9801<sup>®</sup>(日本電気社製)に入力した。

観察期間を通じて全例、動物の保護及び管理に関する法律ならびに実験動物の飼養及び保管等に関する基準に従って飼育管理した。観察終了後安楽死させた後、直ちに眼球摘出を行い、2%グルタルアルデヒド(0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.2)で30分間前固定したのち角膜輪部で眼球を分割してから2%グルタルアルデヒドと2%ホルムアルデヒド(0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.2)の混合液で固定した。24時間固定の後、眼球を水平方向に3分割し、脱水・パラフィン包埋し連続切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色による光学顕微鏡観察を行った。また、脱水後エポキシ樹脂包埋し、酢酸ウラン・クエン酸鉛にて二重染色を施して電子顕微鏡で観察した。特に組織学的検討については、各検査による影響を避けるため硝子体注入と眼底検査のみを行い同期間飼育した各群3匹計9匹も検討した。

また、統計学的検討はDunnnett法を用いて行った。

### III 結 果

各ステロイド剤のpHは6.3~6.5で、浸透圧は懸濁液であったため測定できなかった。対照として用いた生理食塩水のpHは6.3であった。

注入時の器械的な眼球損傷や感染性眼内炎のため観察を中止したものを除外し、各群7匹ずつ計21匹42眼について検討した結果を示す。

〔検眼鏡的所見〕倒像鏡検査では各ステロイド剤投与群および対象群の各群とも観察期間を通じて網膜および硝子体に著明な変化を認めなかった(図1, 2)。

薬剤の吸収減少に関してはフルオロメトロン注入群とテトラヒドロコルチゾール注入群の間に差異があった。フルオロメトロン注入群では投与後7日から21日の間に肉眼的に減少したが、その減少速度は緩徐であり観察終了時の投与後28日の段階で完全に消失したものは無かった。これに対しテトラヒドロコルチゾール注入群では同じく投与後7日から21日の間に減少したが、フルオロメトロン注入群に比し吸収速度は速く、投与後21日目までに7眼中4眼において肉眼的に薬剤が確認されなくなり、観察終了時には全例で薬剤は認められなかった。

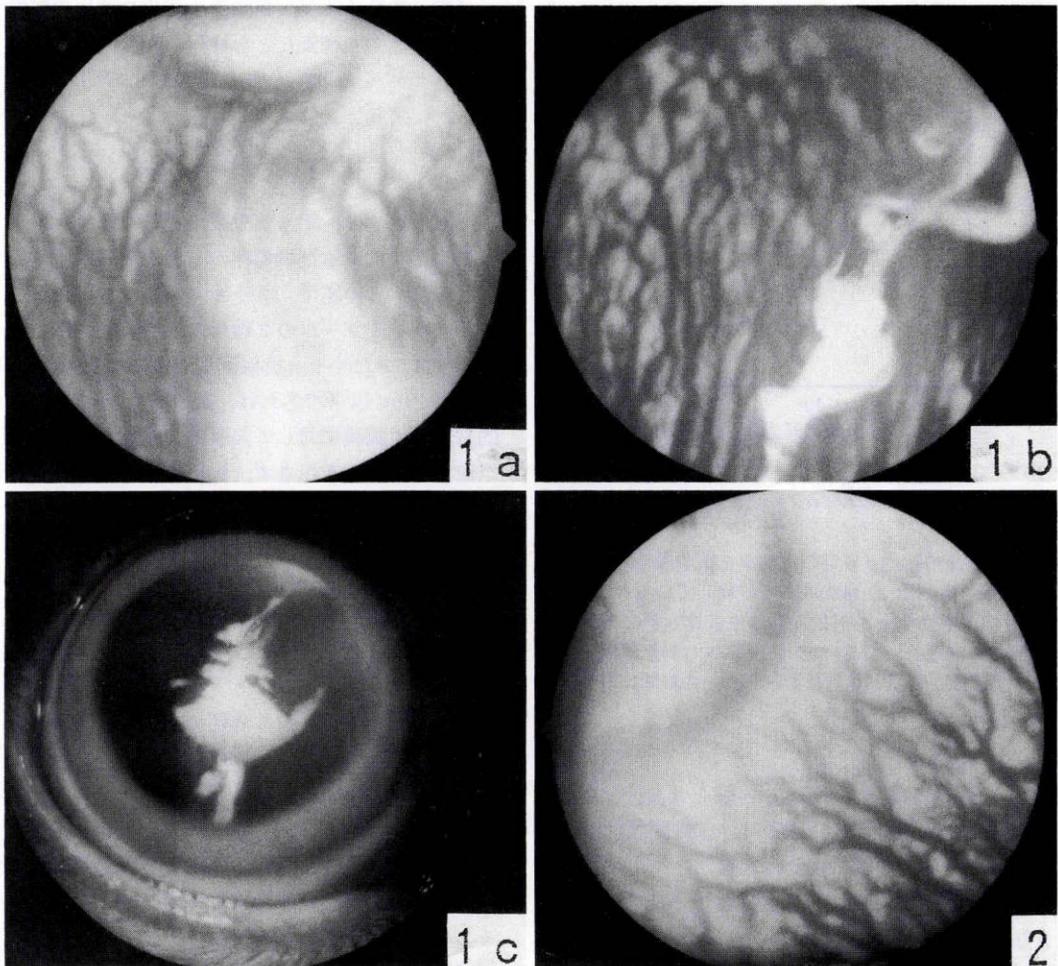


図1 フルオロメトロン注入後28日の眼底写真。  
肉眼的に変化は見られない。a) 視神経乳頭近傍。b) 網膜表面に貯留している例。  
c) 水晶体後面付近に貯留している例。

図2 テトラヒドロコルチゾール注入後28日の眼底写真。  
薬剤は消失しており、肉眼的に網膜に変化は見られない。

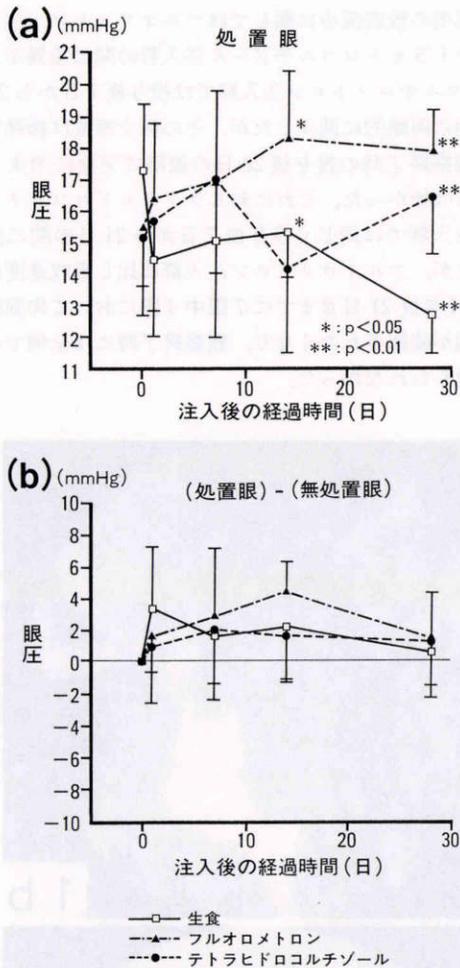


図3 眼圧の変動(各群の平均値と標準偏差)。

a) 処置眼の実測値。正常範囲内で推移しているが、14日と28日に各ステロイド投与群は生食投与群に対し統計学的に有意差がある。b) 同一個体の無処置眼との差。処置前を基準とし増減を示した。各群間に有意差はない。

〔眼圧〕全観察期間を通して各眼とも眼圧は10 mmHg から22 mmHg の間で推移した。処置眼においては投与後14日と28日に生食注入群とフルオロメトロン注入群の間に統計学的有意差があり、投与後28日に生食注入群とテトラヒドロコルチゾール注入群の間に統計学的有意差があった。しかし、処置を施さなかった他眼の眼圧との差を検討すると、注入前と比較して各群間に有意な差はなかった(図3)。

〔ERG〕測定されたa波、b波および律動様小波のO<sub>1</sub>の振幅と頂点潜時を、処置を施さなかった他眼の値

を100とした百分率で表した(図4)。投与前から観察終了までの全期間を通じて各ステロイド剤注入群のa波、b波および律動様小波のO<sub>1</sub>の振幅・頂点潜時は、対照の生食注入群と比較し統計学的に有意な差がなかった。

〔光学顕微鏡所見〕各ステロイド剤注入眼と、対照となる生食注入眼および無処置眼の相当する部位を比較してみて、光学顕微鏡レベルで両者間に明らかな相違はなかった(図5)。即ち網膜、視神経乳頭および脈絡膜での炎症細胞浸潤、構成細胞の空胞化などの変性や萎縮・減少などの所見に注目して比較したが、対照群と識別することはできなかった。

〔電子顕微鏡所見〕細胞内小器官の変性や顆粒の出現、その他細胞構築などを検討したが、光顕所見と同様にステロイド剤注入眼と対照眼との間に差異はなかった(図6)。

#### IV 考 按

今回の実験は、正常家兎眼の硝子体腔内へのステロイド剤投与による網膜毒性の有無を明らかにするために行った。その結果、フルオロメトロンおよびテトラヒドロコルチゾールの2種類のステロイド剤の硝子体内投与は、少なくとも投与濃度が20 mg/ml以下、総投与量が1 mg以下であれば、投与後1か月という比較的長期間で網膜に対して肉眼的、電気生理学および組織学的に毒性を示さず、眼圧上昇の副作用も来さないと考えられた。

臨床的に消炎および増殖抑制を目的としてステロイド剤の硝子体内投与を考えると、持続的な薬剤作用が要求されると思われる。そこで長期間眼内に留まり持続的に作用すると考えられるステロイド剤を対象とした。今回用いたフルオロメトロンとテトラヒドロコルチゾールは両者とも難水溶性であり、フルオロメトロンは眼科臨床に広く一般に用いられており、しかも比較的眼圧上昇を来さないとされている点から選択し、テトラヒドロコルチゾールは糖質コルチコイドや鉱質コルチコイド活性を持たない新しいステロイド剤でありヘパリン存在下に血管新生に対し強い抑制作用があるとの報告<sup>10)</sup>に基づき選択した。

濃度および注入量はデキサメサゾンおよびトリアムシノロンの硝子体内投与で線維芽細胞の増殖を効果的に抑制しえたとのTanoら<sup>11,12)</sup>の報告から考慮し決定した。また、今回用いたステロイド剤は懸濁液であったために、薬剤の貯留部位と期間が観察できるという

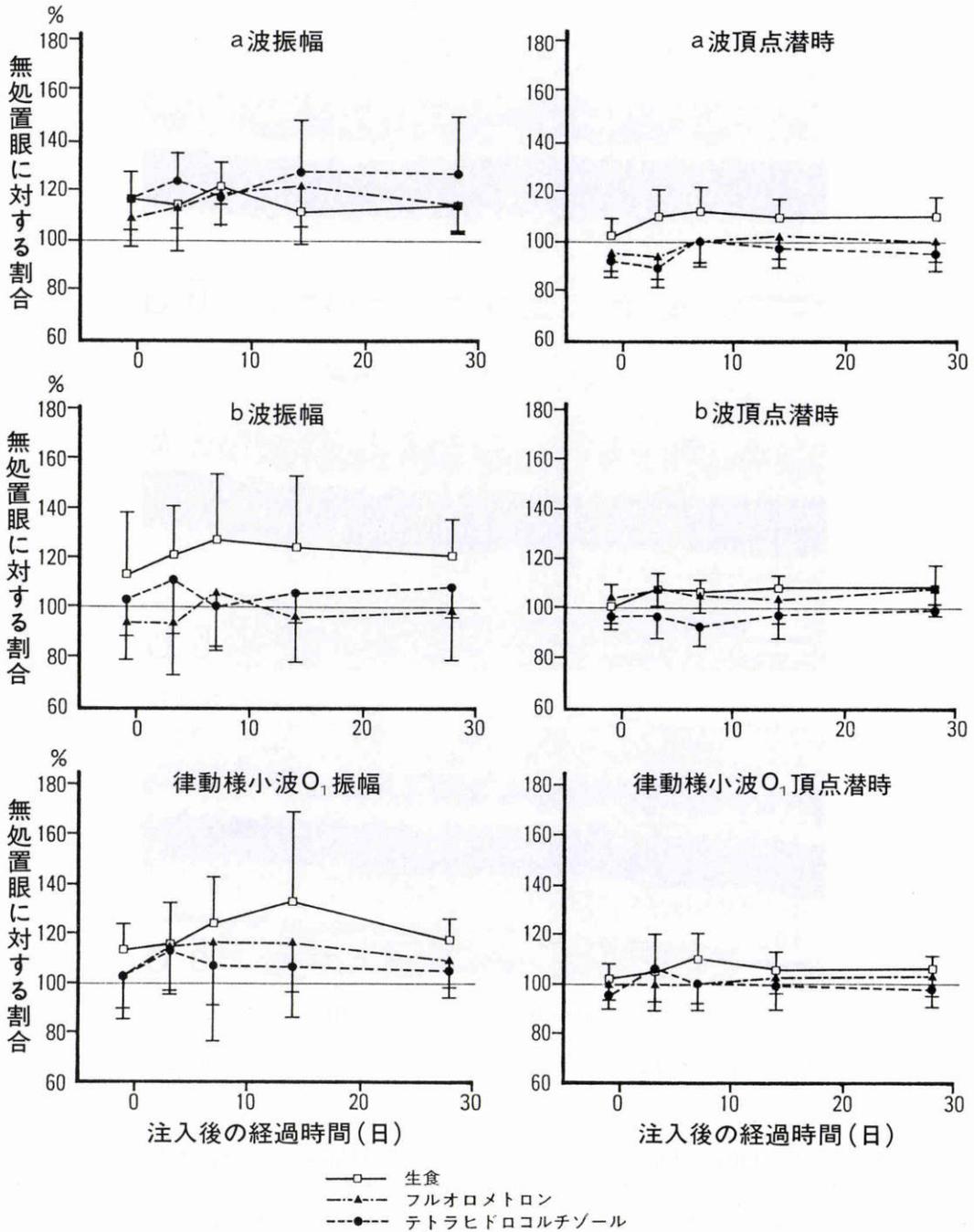


図4 ERG各波の平均振幅と平均頂点潜時の変化。  
無処置眼に対する百分率で表した。各群間に有意な差は認められない。バーは標準偏差を示す。

利点があった。貯留部位からみると、薬剤は水晶体後面から網膜表面まで様々な部位に留まっていた(図1 b, c)。そのうち網膜表面上に沈降した例の網膜内層は

硝子体中央部に投与された例に比較すると投与濃度よりかなり高濃度の薬剤を投与されたのと同等の状態にあったと推定される。そのような症例でも局所の肉眼

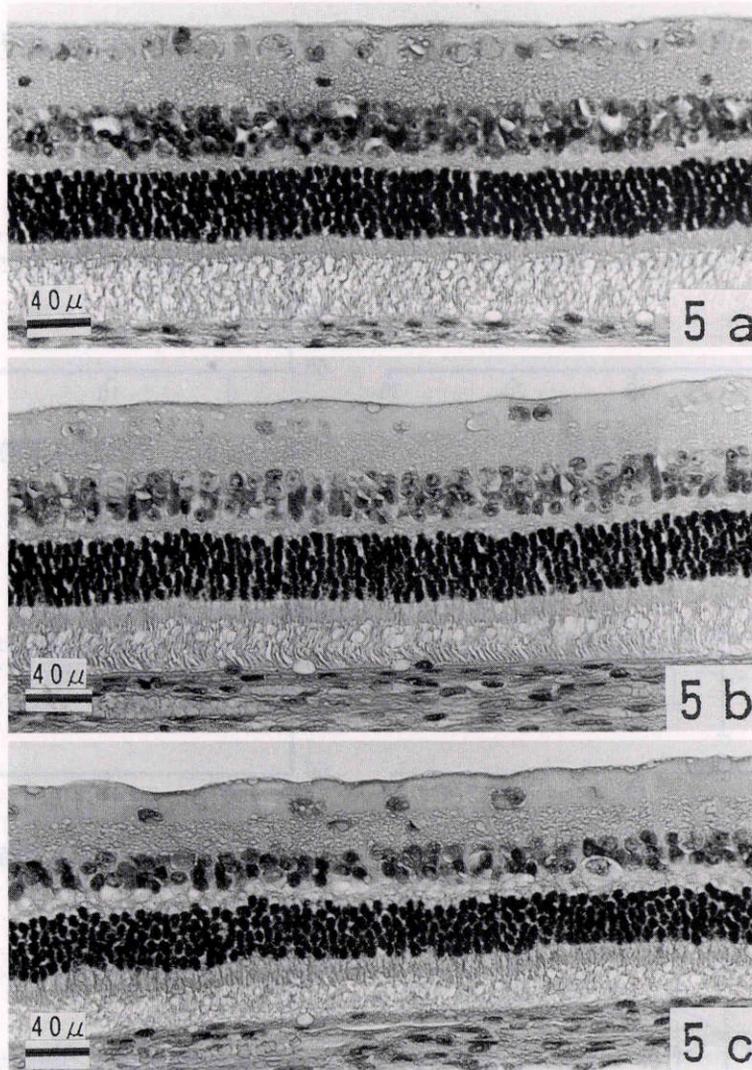


図5 各群注入後28日の網膜の光学顕微鏡所見(HE染色,  $\times 250$ ).

a) フルオロメトロン注入眼, b) テトラヒドロコルチゾール注入眼, c) 生食注入眼. いずれも正常な細胞構築がみられ, ステロイド剤注入眼と生食注入眼を区別することはできない.

的および組織学的変化やERGの変化は認められなかった. 眼内増殖抑制に効果があったとするこれまでの報告<sup>11-5)</sup>とほぼ同量であり, 眼内炎の術中および術後に用いられている量<sup>11)</sup>から考慮して, 臨床上効果が期待できる濃度であると考えられる.

本実験のERG測定は点眼麻酔のみで行っており, 測定に際して家兎の体動などにより若干困難な点があったものの, より生理的な状態で検討が行えたと考える. またERGの評価は個体間のばらつきと同一個

体の各測定間における変動を最小限にするために, 毎回測定した各々のデータについて処置を施さなかった他眼の測定値に対する百分率として表し, 検討した. 本田<sup>12)</sup>は眼内灌流液のpHが7.2~9.5の範囲であればERG上の変化は可逆的であるとしているのに対して, 今回の薬剤のpHは6.3~6.5とやや酸性に傾いていたが, 処置前の値およびpH 6.3の対照群と比較してERGでの有意な差異はなかった. これは, 本田の報告が硝子体手術中の灌流液に関するものであるの対

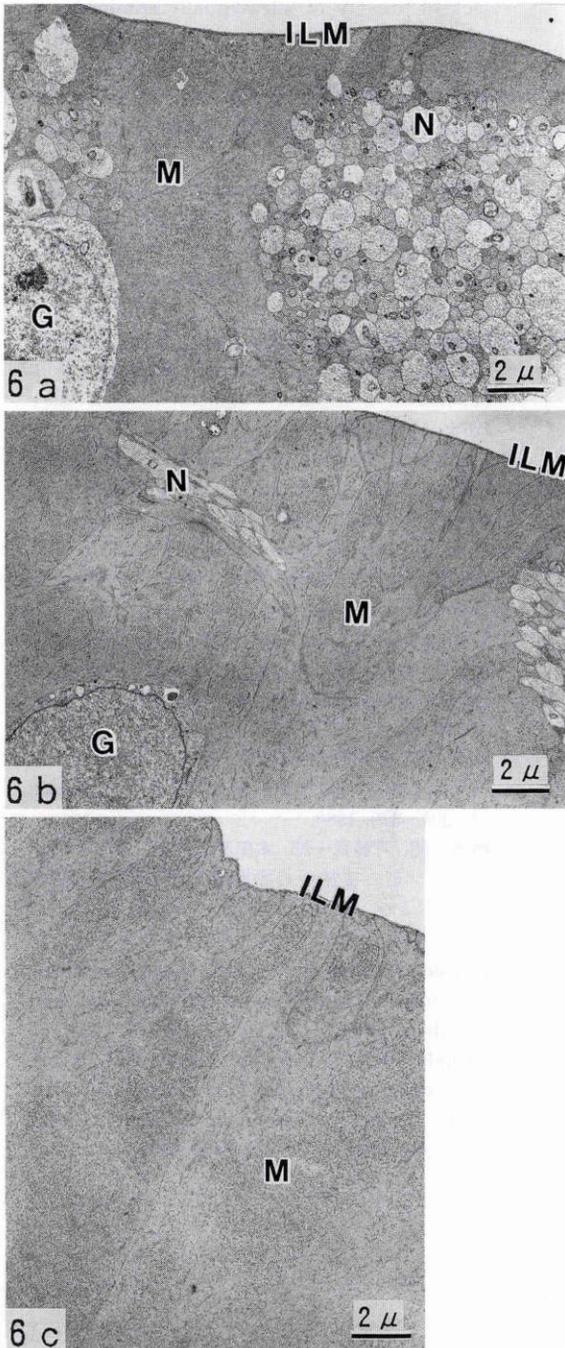


図6 各群注入後28日の電子顕微鏡所見(×6,000). a) フルオロメトロン注入眼. b) テトラヒドロコルチゾール注入眼. c) 生食注入眼. いずれも内境界膜(ILM), 神経線維(N), 神経節細胞(G), Müller細胞(M)などの細胞構築や細胞内小器官に著明な変化を認めず, 各群間に差異はない.

し, 今回の投与では溶液に緩衝液を用いず, 量的にも少量であったためと考えられ, この程度のpHであれば網膜へ影響を及ぼさないと考えられた.

ステロイド剤のERGに及ぼす影響に関しては, Zimmermanら<sup>13)</sup>が内服でa波, b波の振幅が増大することを指摘し, これを受けて根木ら<sup>14)15)</sup>が一連の詳細な実験を行ってその原因を追求している. 摘出網膜を用いた *in vitro* の実験の結果,  $8 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-4}$  g/ml以上でb波振幅の増大, さらに大量の投与では急激な減少をみたとしている. また, Koizumiら<sup>16)</sup>は家兎で無水晶体眼作製後に硝子体中に50 mg/mlのベータメサゾン<sup>16)</sup>を5 mg投与し, b波振幅の増大は投与後3~4日目に最大になり7~20日間続いたとしている. 今回の実験に比べ濃度で2倍以上, 投与量で5倍であるが, その様な大量投与でもその影響はわずかなものであると結論し, 将来のステロイド硝子体内投与による治療の可能性について言及している. これに関して今後は *in vivo* でのさらに詳しい検討が待たれる.

組織学的検討に関しては, 島田ら<sup>8)</sup>は10 mg以上のベータメサゾンおよびデキサメサゾンの硝子体内投与で網膜全層の変性やブルッフ膜からの分離が見られたとし, Hidaら<sup>9)</sup>は市販されている副腎皮質ホルモン剤の溶媒の硝子体内投与実験で外顆粒層の消失や髄翼付近の神経線維層の壊死などがあったとしているが, 本実験では組織学的に変化は見られず対照眼と区別することはできなかった. 今回の投与量は1 mgであり, この程度の量であれば, 過去の報告でも組織学的変化は認められないとしている<sup>7)8)</sup>.

ステロイド剤の局所あるいは全身投与によって眼圧上昇が生じることがあるのは周知の事である. ステロイド緑内障は一般にステロイド投与開始後1か月以内で発症してくるとされており<sup>17)</sup>, 観察期間としては今回の28日間では充分と言える. 観察期間中に生食注入の対照群に比し統計学上有意味な眼圧の差がみられた測定日があったが, 同一個体の無処置対眼の眼圧との間には差がなかったことより, その理由として測定時の個々の家兎の興奮状態の差などが考えられる. 測定値は正常範囲内にあり, また正常範囲内で推移した無処置の他眼の眼圧との差の変動を処置前を基準としてみると有意差はなかったことより, 観察終了時に全例検眼鏡で薬剤を認めなかったテトラヒドロコルチゾールは今回の投与量では眼圧上昇の副作用はないと考えられる. フルオロメトロンは観察終了時に完全に吸収

消失したものはなく、薬剤の効果は未だ持続していると考えられるが、少なくとも1か月で眼圧上昇は来さないと考えられた。

臨床応用を考えると、適応となる症例には硝子体手術後の無硝子体眼も多く含まれてくる。硝子体が無いと薬剤の拡散が容易になり、薬剤が直接網膜に接触するなど条件が異なってくるので、今後は硝子体手術施行モデルを作成し、検討する必要があると思われる。また臨床上有効濃度を知る必要があるため、今後網膜障害の濃度依存性の検討をしていく予定である。

#### 文 献

- 1) **Tano Y, Sugita G, Abrams G, et al:** Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. *Am J Ophthalmol* 89: 131-136, 1980.
- 2) **Tano Y, Chandler D, Machemer R:** Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 90: 810-816, 1980.
- 3) **Chandler D, Rozakis G, Juan E, et al:** The effect of triamcinolone acetonide on a refined experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 99: 686-690, 1985.
- 4) **Raichand M, Peyman G, Schwartz H, et al:** Anti-inflammatory action of dexamethasone in vitrectomy infusion fluid. *Ophthalmic Surg* 13: 493-498, 1982.
- 5) **Koerner F, Merz A, Gloor B, et al:** Postoperative retinal fibrosis—A controlled clinical study of systemic steroid therapy. *Albrecht von Graefe's Arch Klin Exp Ophthalmol* 219: 268-271, 1982.
- 6) **Graham R, Peyman G:** Intravitreal injection of dexamethasone. Treatment of experimentally induced endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 92: 149-154, 1974.
- 7) **McCuen B, Blesser M, Tano Y, et al:** The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 91: 785-788, 1981.
- 8) **島田宏之, 松井瑞夫:** 硝子体内注入ステロイドの家兎眼内組織へ及ぼす影響. *日眼会誌* 93: 501-510, 1989.
- 9) **Hida T, Chandler D, Arena J, et al:** Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations. *Am J Ophthalmol* 101: 190-195, 1986.
- 10) **Crum R, Szabo S, Folkman J:** A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 230: 1375-1378, 1985.
- 11) **Peyman G, Vastine D, Meisels H:** The experimental and clinical use of intravitreal antibiotics to treat bacterial and fungal endophthalmitis. *Doc Ophthalmol* 39: 183-201, 1975.
- 12) **本田孔士:** 硝子体の諸問題II. 硝子体外科のバイオロジー. *日眼会誌* 85: 1910-1949, 1981.
- 13) **Zimmerman TJ, Dawson WW, Fitzgerald CR:** Part I: Electroretinographic changes in normal eyes during administration of prednisone. *Ann Ophthalmol* 5: 757-765, 1973.
- 14) **根木 昭, 本田孔士, 河野真一郎:** ステロイドホルモン剤の視覚への影響に関する研究. *日眼会誌* 84: 304-310, 1980.
- 15) **根木 昭, 河野真一郎, 本田孔士, 他:** ステロイドホルモン剤の視覚への影響に関する研究—ERG a,b波およびVECPへの影響—. *眼紀* 31: 829-833, 1980.
- 16) **Koizumi K, Honda Y:** ERG changes after an injection of corticosteroid into the vitreous. *Metabolic Ophthalmology* 85: 13-16, 1984.
- 17) **Armaly MF:** Effects of corticosteroids on intraocular pressure and fluid dynamics. I. The effect of dexamethasone in the normal eye. *Arch Ophthalmol* 70: 482-491, 1963.