

網膜芽細胞腫の眼球保存療法の研究

—メルファラン硝子体内注入のウサギ網膜に及ぼす影響—

上田 満之¹⁾, 田辺 譲二¹⁾, 猪俣 素子²⁾, 金子 明博³⁾, 木村 毅⁴⁾¹⁾金沢大学医学部眼科学教室, ²⁾国立がんセンター研究所薬効試験部³⁾国立がんセンター中央病院眼科, ⁴⁾千葉大学医学部眼科学教室

要 約

抗腫瘍剤メルファランの網膜毒性を来さない硝子体内注入量を決定することを目的に、ウサギでメルファラン硝子体注入後に長期にわたり網膜電図(ERG)を記録し、また、光学顕微鏡および電子顕微鏡で網膜を組織学的に検討した。メルファラン 90 μg 硝子体内注入ではERGが消失し、かつ網膜組織が外層を中心に著しく破壊された。メルファラン 20 μg 硝子体内注入ではa波、b波、c波の一部および律動様小波が減弱し、網膜組織の一部に変性像がみられた。メルファラン 10 μg 硝子体内注入ではERGおよび組織学的に網膜に対する影響はみられなかった。メルファラン 10 μg 硝子体内注入量は硝子体内

濃度ではほぼ5.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と推定され、前報の摘出眼杯ERGに対する影響および本報知見を併せ考えると、メルファラン 10 μg 硝子体内注入は正常網膜への影響は少ないと考えられる。Colony assayによるメルファラン網膜芽細胞腫に対する最小有効濃度(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)も考慮すると、メルファランは網膜芽細胞腫の化学療法に有用であると考えられる。(日眼会誌 99: 1230—1235, 1995)

キーワード: メルファラン, 硝子体内注入, 網膜芽細胞腫, 網膜電図, ウサギ

Study on Conservative Treatment of Retinoblastoma

—Effect of Intravitreal Injection of Melphalan on the Rabbit Retina—

Mitsuyuki Ueda¹⁾, Jhoji Tanabe¹⁾, Motoko Inomata²⁾Akihiro Kaneko³⁾ and Tsuyoshi Kimura⁴⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine²⁾Pharmacology Division, National Cancer Center Research Institute³⁾Department of Ophthalmology, National Cancer Center Hospital⁴⁾Department of Ophthalmology, Chiba University School of Medicine

Abstract

Effects of an intravitreal injection of melphalan on the electroretinogram and on the retinal structure were studied in albino rabbits to establish the non-toxic dose for its intravitreal use. The a-wave, the b-wave, the c-wave, the oscillatory potential and the retinal structure remained unchanged after 10- μg injection, but moderately changed after 20- μg injection and greatly deteriorated after 90- μg injection. A 10- μg injection is equal to an intravitreal concentration of about 5.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, if evenly diffused in the rabbit vitreous. Considering

that colony formation of *in vitro* retinoblastoma cells is completely suppressed by melphalan at 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration, an intravitreal application of melphalan could be used as a non-surgical treatment for retinoblastoma. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1230—1235, 1995)

Key words: Melphalan, Intravitreal injection, Retinoblastoma, Electroretinogram, Rabbit

別刷請求先: 920 石川県金沢市宝町 13-1 金沢大学医学部眼科学教室 上田 満之

(平成7年4月6日受付, 平成7年7月17日改訂受理)

Reprint requests to: Mitsuyuki Ueda, M.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine. 13-1 Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa-ken 920, Japan

(Received April 6, 1995 and accepted in revised form July 17, 1995)

I 緒 言

網膜芽細胞腫の眼球保存療法の一つに、金子¹⁾が開発した眼球温熱化学療法がある。この方法は、抗腫瘍剤であるメルファランを眼動脈に超選択的に注入するか、または硝子体内に注入してから眼球を加温するものである。この療法においては、過量の抗腫瘍剤の眼動脈または硝子体内注入によって眼組織(特に網膜)の健全な領域が破壊されないように注意すべきである。前報²⁾では、ウサギおよびヒトの摘出眼杯の網膜電図(*in vitro* ERG)を指標として、網膜機能を障害しないメルファラン濃度を決定した。*In vitro* ERG法では意図する濃度の薬剤の溶液が確実に網膜に接触するので、薬剤の網膜への影響を直接的に検証できるという利点があるが、長時間のERG記録は行えないので、長期にわたる影響を検討できない。本報では、網膜毒性を来さないメルファラン硝子体内注入量を決定することを目的として、ウサギ硝子体内にメルファランを注入した後に長期にわたりERGを記録し、また網膜を組織学的にも検討した。

II 実験方法

体重2~3 kgの白色ウサギ10匹を使用した。オペガード® MA(千寿製薬)0.1 mlに溶解した10, 20および90 μ gのメルファラン(シグマ, セントルイス, 米国)をそれぞれ3, 4および3匹の片眼の硝子体内に注入した。メルファランが約1.7 mlのウサギの硝子体内に均等に拡散すると仮定した場合には、上記の注入量では硝子体内濃度はそれぞれ5.9, 12および53 μ g/mlと推定される。他眼(僚眼)の硝子体内には、対照として0.1 mlのオペガード® MAのみを注入した。眼圧上昇を避けるために、両眼ともに0.1 mlの前房水を吸引排除した。以上の硝子体内注入の手技の詳細は既報³⁾と同じである。ウサギ *in vivo* ERGの記録方法は既報³⁾と同じである。角膜面照度 5×10^3 lux, 持続時間500 msec, 刺激頻度1/3 Hzの矩形波光(a波, b波および律動様小波(OP)用), または角膜面照度5 lux, 持続時間5 msec(b波およびc波用)の白色矩形波刺激光を用いた。硝子体内注入前, 注入後3時間, 3日目, 1週間目, 2週間目および4週間目にERGを記録した。片眼を被験眼, 他眼を対照眼として, 左右眼でERGを比較した。a波, b波およびOPでは振幅ならびに頂点潜時を, c波では振幅を各測定時点ごとに計測した。b波の計測には, 角膜面照度 5×10^3 lux, 持続時間500 msec, 刺激頻度1/3 Hzの矩形波光によって惹起された波形を用いた。OP振幅の計測は米村⁴⁾の計測法に準じた。ERG振幅変化に関する有意性の判定基準として, Zacharyら⁵⁾の報告ならびに硝子体内注入という手技の網膜に対する影響を考慮して, $\pm 20\%$ 以内の振幅変化は有意とみなさなかった。

硝子体内注入後4週間目にERGを記録した後、ウサギ

をペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の静脈内注射で屠殺し、直ちに眼球を摘出した。摘出眼球を2.5% グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液に約20分間浸漬固定した後、眼球赤道部に沿って眼球を切半した。眼球後極部側をオスミウム酸で後固定後にエポキシ樹脂に包埋し、1 μ mの厚さに薄切した。1% トルイジン青で染色して光学顕微鏡で観察した後、さらに超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. メルファラン 10 μ g 硝子体内注入群

記録したERGの典型例を図1に示す。a波, b波, c波およびOPの振幅(図3 A, 4 A, 5 A, 6 A)およびa波, b波およびOPの頂点潜時には、注入後4週間目までの時点においても対照眼とメルファラン注入眼との間に有意

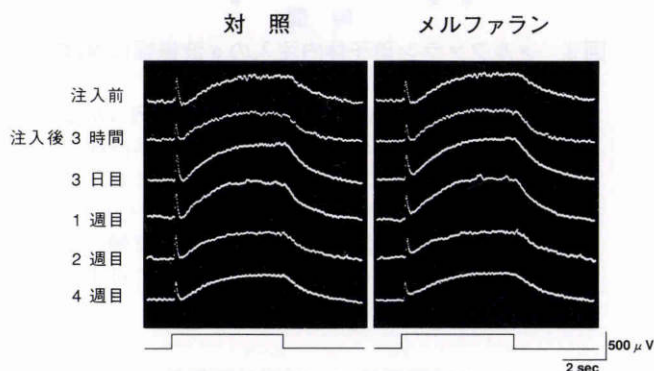


図1 メルファラン 10 μ g 硝子体内注入がウサギ網膜電図に及ぼす影響。

対照眼と比べてメルファラン注入眼のb波およびc波に明らかな変化はなかった。最下段の矩形波の上向きおよび下向きの振れは、それぞれ刺激光の開始と終息の時点を示す。直流増幅。角膜面刺激光照度5 lux。

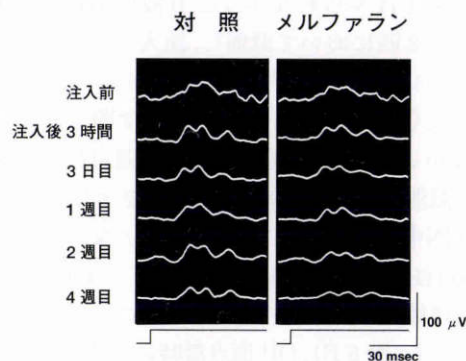


図2 メルファラン 20 μ g 硝子体内注入がウサギ律動様小波に及ぼす影響。

対照眼と比べてメルファラン注入眼の律動様小波は、注入後3日目以後明らかに減弱した。時定数3 ms。最下段の矩形波の上向きの振れは、刺激光の開始時点を示す。角膜面刺激光照度 5×10^3 lux。

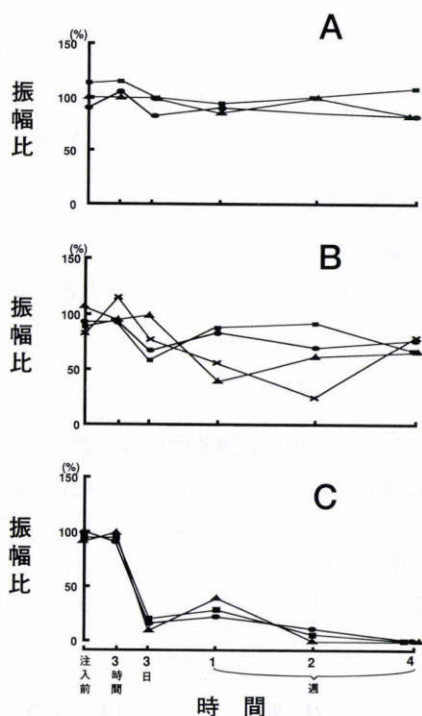


図3 メルファラン硝子体内注入のa波振幅に及ぼす影響。

メルファラン 10 μg 硝子体内注入(A)では明らかな変化はなかった。メルファラン 20 μg 硝子体内注入(B)では注入後4週には4匹すべてにおいて有意に減少した。メルファラン 90 μg 硝子体内注入(C)では注入後3日目以降減少ないし消失した。縦軸にはメルファラン注入眼のa波振幅を対照眼に対する百分率で示す。

差はなかった。光学顕微鏡および電子顕微鏡では、網膜組織像に異常はみられなかった。

2. メルファラン 20 μg 硝子体内注入群

記録したERGの典型例を図2に示す。a波振幅は注入後3日目に4匹中3匹において減弱し、その後回復傾向を示さず、注入後4週目には4匹すべてにおいて65~78%と有意に減弱した(図3B)。a波頂点潜時には明らかな変化はみられなかった。b波振幅は注入後1週目に4匹中2匹において減弱し、注入後4週目には4匹中3匹において約72%、残る1匹において55%と有意に減弱した(図4B)。b波頂点潜時には明らかな変化はみられなかった。c波振幅は注入後1週目に4匹中3匹において減弱したが、その後回復傾向を示し、注入後4週目には4匹中3匹において80~88%となった(図5B)。OP振幅は注入後3日目に4匹すべてにおいて減弱し、その後回復傾向はなく、注入後4週目には33~57%と有意に減弱した(図6B)。OP頂点潜時には明らかな変化はみられなかった。光学顕微鏡では網膜内層に明らかな変化はみられなかったが、外層において網膜色素上皮細胞(RPE)は高さを減じ、外節の配列の不整・崩壊が認められた。電子顕微鏡では、外節は高電子密度の変性物質となっているものも多く、それらにおいてラメラ構造はわ

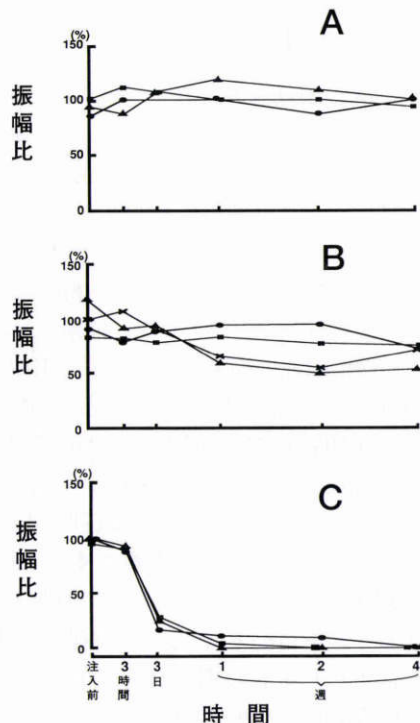


図4 メルファラン硝子体内注入のb波振幅に及ぼす影響。

メルファラン 10 μg 硝子体内注入(A)では明らかな変化はなかった。メルファラン 20 μg 硝子体内注入(B)では注入後4週には4匹すべてにおいて有意に減少した。メルファラン 90 μg 硝子体内注入(C)では注入後3日目以降減少ないし消失した。縦軸にはメルファラン注入眼のb波振幅を対照眼に対する百分率で示す。

ずかに認められるのみであった。RPEでは、滑面小胞体など細胞質内小器官の変性・崩壊がみられた(図7)。

3. メルファラン 90 μg 硝子体内注入群

注入後3時間では、ERG各波には明らかな変化はみられなかったが、注入後3日目には各波の振幅は著しく減弱または消失した。その後も回復傾向はなく、注入後4週にはc波の一部を除いてERGは消失した(図3C, 4C, 5C, 6C)。光学顕微鏡および電子顕微鏡において網膜外層を構成する細胞要素の多くが消失しており、Müller細胞突起が伸展し細胞消失部位を置換していた。Müller細胞の細胞質は滑面小胞体、細線維、グリコーゲン顆粒を持ち、しばしばリポド顆粒や高電子密度の顆粒状物質を保有していた。メルファラン 90 μg 硝子体内注入群では、視細胞外節に無数の高電子密度物質を含むMüller細胞が認められ、それらがBruch膜を穿破して脈絡膜へ進入していた。Bruch膜内のそれらの細胞突起は滑面小胞体、細線維などの特徴からMüller細胞と同定された(図8)。

IV 考 按

金子¹⁾が眼球温熱化学療法にメルファランを選んだ理

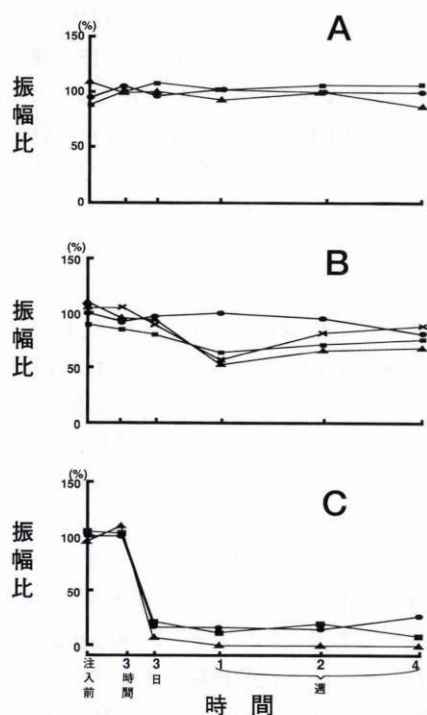


図5 メルファラン硝子体内注入のc波振幅に及ぼす影響。

メルファラン 10 μg 硝子体内注入(A)では明らかな変化はなかった。メルファラン 20 μg 硝子体内注入(B)では注入後1週には4匹中3匹において減少したが、その後回復し、4週には4匹中1匹において減少した。メルファラン 90 μg 硝子体内注入(C)では注入後3日目以降減少ないし消失した。縦軸にはメルファラン注入眼のc波振幅を対照眼に対する百分率で示す。

由は、二重軟寒天培地での網膜芽細胞腫の colony assay による抗腫瘍剤感受性試験において、マイトマイシンやビンクリスチンなど12種の抗腫瘍剤のうち、メルファランが最も強力な colony 形成阻止力を呈したからである。メルファラン 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、網膜芽細胞腫13例のうち12例(92%)で colony 形成が阻止され、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では全例で阻止された⁶⁾。また、42°C、1時間の加温を併用した場合には colony 形成阻止力がさらに増強した⁶⁾。前報²⁾では、メルファラン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ はウサギ摘出眼杯ERGにおいてb波振幅を有意に低下させたが、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ はヒトおよびウサギ摘出眼杯ERGの各波に影響を及ぼさなかった。したがって、メルファラン 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では正常網膜への影響は少ないものと考えられた。しかし、摘出眼杯ERGを指標とした検討では、網膜に対する急性毒性を検討できるが、長期にわたる影響の検討は不可能である。

本実験では、メルファランのウサギ網膜に対する慢性的影響を電気生理学的および組織学的に検討し、メルファラン硝子体内注入量を決定することを目的とした。メルファラン 90 μg 硝子体内注入ではERGが消失し、かつ網膜組織が極端に破壊されていた(図3C, 4C, 5C,

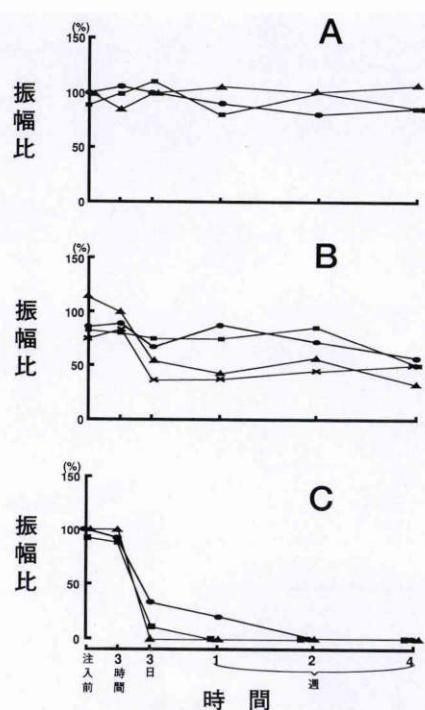


図6 メルファラン硝子体内注入の律動様小波の振幅に及ぼす影響。

メルファラン 10 μg 硝子体内注入(A)では明らかな変化はなかった。メルファラン 20 μg 硝子体内注入(B)では注入後3日目には4匹すべてにおいて減少し、その後回復傾向はなかった。メルファラン 90 μg 硝子体内注入(C)では注入後3日目以降減少ないし消失した。縦軸にはメルファラン注入眼の律動様小波の振幅を対照眼に対する百分率で示す。

6C, 8)。硝子体内に注入されたメルファランが約1.7 mlのウサギの硝子体内に均等に拡散されるならば(以下同様)、90 μg 硝子体内注入ではメルファランの硝子体内濃度はほぼ53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当するので、上記の本報所見は摘出眼杯ERGの結果²⁾によく対応する。メルファラン 20 μg 硝子体内注入ではa波、b波、c波の一部およびOPが減弱し、網膜組織の一部に変性像がみられた(図3B, 4B, 5B, 6B, 7)。メルファラン 20 μg 硝子体内注入量では、硝子体内濃度はほぼ12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当するが、摘出眼杯ERG²⁾はメルファラン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では変化しなかった。前報²⁾では、メルファランを添加した浸漬液を15分間灌流してERGを記録しており、網膜に対するメルファランの急性毒性を検討している。メルファラン 20 μg 硝子体内注入の本実験結果は前報²⁾の10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 灌流の結果と一見符合しないようにみえるが、本実験でERGの振幅減弱がみられたのは硝子体内注入後3日目以降であり、この変化はメルファランの網膜に対する慢性的影響を反映しているかも知れない。メルファラン 20 μg 硝子体内注入ではc波振幅に回復傾向がみられたが(図5B)、RPEの組織学的変化は細胞内小器官の変性にとどまり(図7)、c波の主な発生母体はRPEにあるといえども、RPE以外で生ずる電位もc波に関与すると考えられ

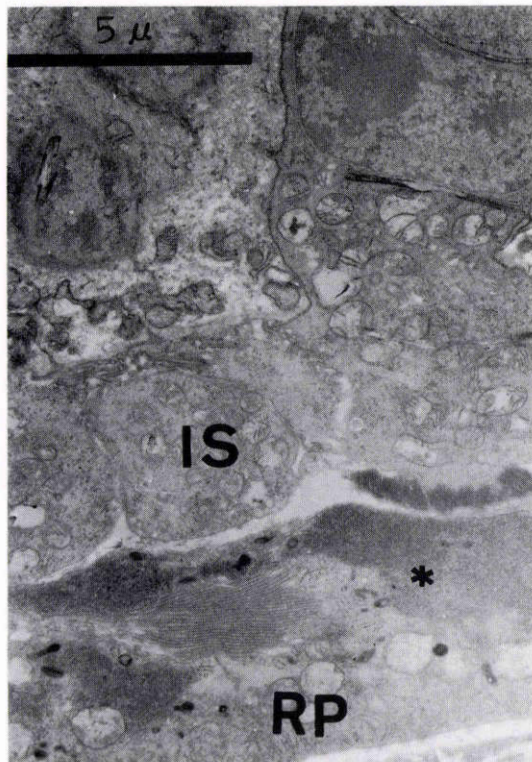


図7 メルファラン 20 μg 硝子体内注入 4 週後のウサギ網膜外層の電子顕微鏡像。

網膜色素上皮細胞 (RP) は高さを減じ、それらの細胞質内小器官は内節 (IS) のそれとともに変性している。網膜下の高電子密度の物質 (* 印) は外節由来とみなされる。

る⁷⁾。メルファラン 20 μg 硝子体内注入では、OP 振幅が減弱しても OP 頂点潜時に明らかな変化がみられなかったが (図 2, 6 B), このような異常は病眼 ERG において遭遇することがある⁸⁾。メルファラン 10 μg 硝子体内注

入では、ERG および組織学的に網膜に対する影響はみられなかった (図 3 A, 4 A, 5 A, 6 A)。この注入量では、硝子体内濃度ではほぼ 5.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と推定され、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メルファランでは ERG が変化しないという摘出眼杯における成績²⁾と本報での成績は矛盾せず、この程度の注入量では慢性実験においても網膜毒性は少ないと考えられる。

メルファラン注入後網膜を組織学的に検討すると、最初に障害されるのは RPE と考えられる。RPE 障害が進行すると外節は RPE によって摂取されず、時折ラメラ構造のみられる高電子密度の物質として網膜下に蓄積される。そして、崩壊した内節とともに Müller 細胞突起で置換される。この部位にみられる Müller 細胞は多数の dense body や myelin figure を含んでいるが、これらは貪食された外節などの変性物質由来と推測される。このような Müller 細胞は Bruch 膜を穿破する。また、外節、内節も消失しており、メルファラン 90 μg 硝子体内注入は不可逆的な著しい変化を網膜に生じさせている。

眼球温熱化学療法は、臨床的には放射線外照射後の再発腫瘍や硝子体播種などを適応として現在実施されている⁹⁾。バルーンカテーテルを使用して選択的に眼動脈に注入する場合にはメルファラン 10 mg/m^2 (体表面積) を、30 G 針を使用して経結膜的に毛様体扁平部から硝子体内注入する場合にはメルファラン 4 μg を注入し、いずれもその後に眼球を加温している。メルファランの硝子体内注入は腫瘍細胞の飛散をもたらす危険性を有するが、これまで眼球摘出の適応であった硝子体播種例にも有効であり、また、血流が少ないためか選択的眼動脈注入では効果が不十分であった鋸状縁近くの腫瘍にも適応可能である。臨床的に使用されているメルファラン 4 μg 硝

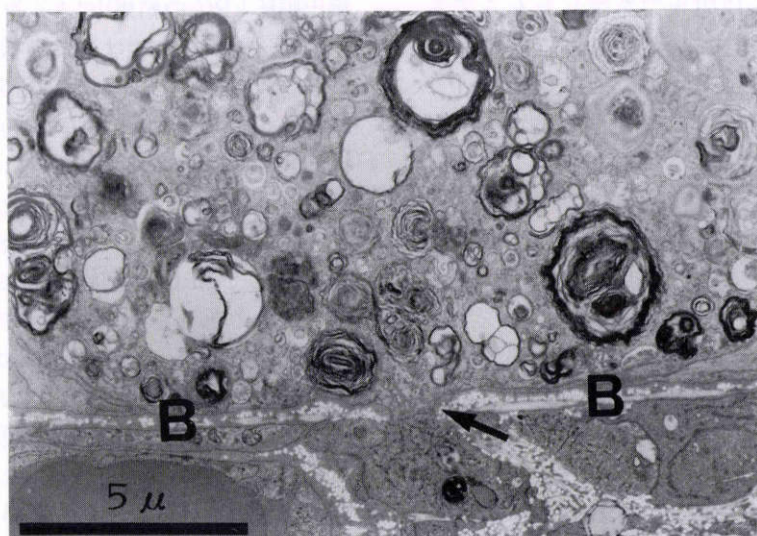


図8 メルファラン 90 μg 硝子体内注入 4 週後のウサギ網膜外層の電子顕微鏡像。

消失した視細胞外節、内節と置換した Müller 細胞。多数の dense body や myelin figure などを含み、Bruch 膜 (B) を穿破 (矢印) して脈絡膜へ侵入している。その部位の Müller 細胞の細胞質にも滑面小胞体が多数認められる。

子体内注入はウサギとヒト小児の眼球の違いはあるものの、本報の成績に鑑みると、眼毒性を来さない許容限界内の注入量であると思われる。

選択的に眼動脈に注入されたメルファランが網膜に達するには、血液網膜関門を通過する必要がある。メルファランの血液網膜関門通過性についての報告は著者らが知る限りではないが、血液脳関門に関してはマウスに10 mg/kgを静脈内注射した5分後の脳内濃度は0.87 µg/mlであり、脳血液濃度比は0.20であったという¹⁰⁾。また、他の抗腫瘍剤の患側総頸動脈注射後の血清濃度に対する腫瘍内濃度の比の平均値は、5-フルオロウラシルで4.13、プレオマイシンで1.29と報告¹¹⁾され、薬剤によって違うようである。したがって、選択的に眼動脈に注入されたメルファランがどの程度、網膜に達しているかは不明である。眼球温熱化学療法より安全で、より効果的な条件を設定するためには、メルファランの選択的眼動脈注入、または硝子体内注入後の眼内動態の検討や眼球加温を併用した場合の網膜への影響についても今後検討する必要がある。

本論文の要旨は第57回日本中部眼科学会において報告した。河崎一夫教授の御校閲に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 金子明博：網膜芽細胞腫の診断と治療。あたらしい眼科 8: 1565—1571, 1991.
- 2) 上田満之, 田辺譲二, 鈴木俊之, 酒井宏之, 望月清文, 北野貢市, 他：網膜芽細胞腫の眼球保存療法の研究

—摘出眼杯網膜電図に及ぼすメルファランの影響—。日眼会誌 98: 352—356, 1994.

- 3) 鳥崎真人：塩酸ロメフロキサシンの硝子体内許容投与量とその眼内動態に関する研究。十全医会誌 103: 491—516, 1994.
- 4) 米村大蔵, 河崎一夫：律動様小波とその臨床。田沢豊(編)：眼科 Mook, 14, 眼と電気生理, 金原出版, 東京, 59—70, 1980.
- 5) Zachary IG, Forster RK: Experimental intravitreal gentamicin. Am J Ophthalmol 82: 604—611, 1976.
- 6) Inomata M, Kaneko A: Chemosensitivity profiles of primary and cultured human retinoblastoma cells in a human tumor colonogenic assay. Jpn J Cancer Res 78: 858—868, 1987.
- 7) 米村大蔵, 河崎一夫：臨床網膜電図。医学書院, 東京, 87—88, 1985.
- 8) 米村大蔵, 河崎一夫：臨床網膜電図。医学書院, 東京, 147—196, 1985.
- 9) 金子明博, 伊勢 泰, 大平睦郎, 高山 順, 渋谷壮一郎, 松岡浩司, 他：眼球温熱化学療法で治癒した眼球内に再発した網膜芽細胞腫の2例。臨眼 44: 289—292, 1990.
- 10) Mellet LB: Physicochemical consideration and pharmacokinetic behavior in delivery of drugs to the central nervous system. Cancer Treat Rep 61: 527—531, 1977.
- 11) 金子明博：網膜芽細胞腫の薬物療法に関する研究。日眼会誌 81: 855—860, 1977.