

# Nontoxic Concentration of Gentamicin Sulfate for Intravitreal Use

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8401">http://hdl.handle.net/2297/8401</a>

## 網膜におよぼす硫酸ゲンタマイシンの影響

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

望 月 清 文

(平成4年10月8日受付)

アミノグリコシド系抗生剤、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate, GM) の硝子体内注入が網膜におよぼす急性および慢性的影響を、網膜電図 (electroretinogram, ERG) の a 波, b 波, 律動様小波 (oscillatory potential, OP) および一部の試験では c 波, 視覚誘発電位 (visually evoked potential, VEP) ならびに組織学的所見を指標として白色および有色ウサギで検討した。また電気生理学および組織学的検討に基づいて眼内投与しても安全と判断された量の GM を硝子体切除眼に投与した際の網膜毒性の有無を電気生理学および組織学的検査法にて検討した。次に同量の GM を硝子体内投与した際の GM の眼内動態を検討し、その眼内動態から GM の再注入が望ましいと推測される時期に前記の安全注入量を硝子体内に反復投与した際の網膜への影響についても検討した。さらに硝子体内への安全な投与量から推定した濃度に GM を添加した眼内灌流液を用いてウサギ眼の硝子体切除を行い GM 添加眼内灌流液の網膜への影響について電気生理学および組織学的検査法にて検討した。GM を全身投与した際の硝子体切除眼あるいは水晶体および硝子体切除眼への GM の眼内移行性についても検討した。ウサギの正常眼において GM 80 $\mu$ g 硝子体内注入では a 波, b 波および OP ならびに VEP の早期成分はほとんど変化しなかった。また組織学的にも対照眼に比し異常所見は認められなかった。硝子体切除眼への GM 80 $\mu$ g 硝子体内注入は網膜に影響をおよぼさなかった。白色ウサギ正常眼への GM 80 $\mu$ g の硝子体内 1 回注入後の硝子体内 GM 濃度の半減期は約31時間であった。GM 80 $\mu$ g の 2 回注入は軽度の ERG 変化を惹起させるので臨床上出来るかぎり避けるべきであると思われた。GM 160 $\mu$ g 硝子体内注入では調べたウサギ 5 匹中 2 匹で注入後 2 週目に ERG が消失した。GM 200 $\mu$ g は注入後 1 週で b 波および OP を軽度に減弱させ、角膜側陰性の緩徐な波形をもたらした。GM 160 および 200 $\mu$ g 硝子体内注入による ERG 変化の中には長期の観察期間内に回復傾向を示すものがあつた。GM 240 $\mu$ g 硝子体内注入では注入後早期 (2~3 時間) に b 波が減弱し、VEP の早期成分は有意には変化しなかったが、慢性的観察では硝子体内注入後 2 週目までに ERG は消失し、ERG 変化は不可逆的であつた。GM 400 $\mu$ g 硝子体内注入の急性的観察では b 波振幅は著明に減少したが、c 波振幅には増大あるいは減少と一定傾向はなかつた。VEP の早期成分は対照眼に比し若干の延長傾向を示したが有意差はなかつた。GM 20 $\mu$ g/ml 硝子体内灌流では硝子体切除後 4 週目までに ERG には対照眼と比べほとんど変化はみられず、組織学的にも異常はみられなかった。GM 50 $\mu$ g/ml 硝子体内灌流では硝子体切除後 1~2 週で軽度の b 波および OP の減弱が認められた。GM 5 mg/kg 全身投与後における硝子体切除眼の硝子体内 GM 濃度は測定限界値以下であつた。水晶体および硝子体切除眼では術後翌日を除いて術後 4 週目まで硝子体内に GM の移行が認められた。電気生理学および組織学的検査法を指標にすると、臨床に用いる際の硝子体内注入量として、網膜毒性の観点から、GM 100 $\mu$ g を推奨する。また硝子体切除術の際に眼内灌流液に添加する GM 濃度として同様の観点から 20 $\mu$ g/ml を越えるべきではない。

**Key words** gentamicin, intravitreal injection, electroretinogram, vitrectomy, clearance from vitreous cavity

細菌性眼内炎の治療に際して、抗生剤の全身投与や結膜下注射あるいは点眼などの局所投与では、眼血液関門のため眼内、特に硝子体内には抗生剤の十分な治療濃度が得られない<sup>1)~3)</sup>とされている。そこで近年、抗生剤の硝子体内注入および硝子体切除術時の眼内灌流液への抗生剤の添加などが注目され、抗生剤の硝子体内注入あるいは眼内灌流液に薬剤を添加した際の眼組織に対する毒性の程度を動物実験で検討し、細菌性眼内炎の治療に有効かつ安全な硝子体内注入量あるいは灌流液添加濃度が報告されている<sup>4)~14)</sup>。これまで報告されている濃度の抗生剤を臨床的に用いた場合の有効性を支持する報告<sup>15)~20)</sup>は数多くみ

られるが、一方では一部で推奨されている硝子体内注入量<sup>4)~7)</sup>、例えば硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate, GM) 400 $\mu$ g を細菌性眼内炎の治療に使用したところ、網膜障害が生じたという報告<sup>21)~25)</sup>もみられる。従つてこの分野の主な研究者である Peyman, Forster, Zachary, Palimeris および D'Amico らの報告<sup>4)~14)</sup>を参考にしても未だ安全な薬剤の硝子体内投与量についての定見がないのが現状といえよう。そこで、本研究では主に電気生理学的検査法を用い抗生剤を硝子体内注入した際のウサギ網膜におよぼす影響について正常眼および硝子体切除眼において検討し、その結果を基に臨床的に抗生剤の至適な硝子体内

Abbreviations: AGs, aminoglycosides; CEZ, cefazolin sodium; CTRX, ceftriaxone sodium; CER, cephaloridine; ERG, electroretinogram; GM, gentamicin sulfate; LFLX, lomefloxacin hydrochloride; MIC, minimum inhibitory concentration; OP, oscillatory potential; PAE, postantibiotic effect; RPE, retinal pigment

注入量について考按する。また安全な硝子体内注入量を眼内に投与した際の眼内動態を検索し、薬剤の硝子体内再注入の必要性および安全性などもあわせて検討する。さらに安全な硝子体内注入量から硝子体切除の際の安全な灌流液添加薬剤濃度を類推しその濃度における薬剤の網膜への影響も検討する。加えて硝子体切除眼あるいは水晶体および硝子体切除眼においてGMを全身投与した際の眼内動態を検索し、手術が眼血液関門におよぼす影響についてもあわせて検討する。本研究では、網膜電図 (electroretinogram, ERG) の a 波, b 波, 律動様小波 (oscillatory potential, OP) および一部の試験では c 波, 視覚誘発電位 (visually evoked potential, VEP) ならびに組織学的検査をも指標として、アミノグリコシド系抗生剤 (aminoglycosides, AGs) のうち最も臨床的に使用されている GM を選択し、GM がウサギ網膜におよぼす影響について検討する。

さて、当教室大野木<sup>20)</sup>は摘出眼杯 ERG を用い GM のウサギ網膜におよぼす影響を検討しているが、本研究での観察法と比較すると摘出眼杯灌流法では網膜におよぼす薬物の作用が直接的であるが、実際に臨床応用する場合には薬剤の眼内濃度の変化、網膜における薬剤の蓄積性および血流の影響などを考慮する必要がある。また摘出眼杯灌流法の環境<sup>20)</sup>は pH, 温度, 電解質組成などの点でウサギの生理学的環境とは異なったものであり、薬物の作用が生体内における場合と異なることが予想される。従って、臨床的に眼内投与を行う際の安全投与量の決定に生体における観察は是非とも必要である。

#### 材料および方法

##### 1. 1 回硝子体内注入法

各実験に先立ち瞳孔は、0.5% トロピカミドと0.5% 塩酸フェニレフリン (ミドリン<sup>®</sup> P, 参天製薬, 大阪) の点眼により十分に散大された。

##### 1. 実験動物, 使用薬剤ならびに注入薬剤濃度

実験動物としては予め一定食餌 (ウサギ用固型 RM-3, 船橋農場, 千葉) にて 1 週間以上飼育した体重 2~3kg の白色ウサギ 35 匹および有色ウサギ 16 匹を使用した。本実験では硝子体内注入前の眼底検査にて網膜に異常が認められたウサギおよび硝子体内注入前の ERG 検査にて左右差が明らかなウサギ (b 波振幅にて 20% 以上) を用いなかった。

使用した GM は研究用原末 (力価 567 $\mu$ g/mg, シェリング・プラウ, 大阪) であった。一部の慢性実験には実際の臨床における硝子体内注入を考慮し、商用 GM (ゲンタシン<sup>®</sup> 注, シェリング・プラウ) を使用した。ゲンタシン<sup>®</sup> 注の 1 アンプル (1ml) 内には、主成分として GM 40mg (力価), 無痛剤としてベンジルアルコール 15mg, 安定剤として乾燥亜硫酸ナトリウム 0.5mg およびピロ亜硫酸ナトリウム 1.5mg が含有されている。

硝子体内注入に際し、GM 研究用原末あるいは商用 GM (ゲンタシン<sup>®</sup> 注, シェリング・プラウ) を眼内灌流液 (オベガード<sup>®</sup> MA, 千寿製薬, 大阪) で溶解してそれぞれ 0.1ml あたり 80, 160, 200, 240, 400 または 800 $\mu$ g の GM を含む硝子体内注入用薬剤を作製した。

GM の硝子体内注入量 ( $\mu$ g) および硝子体内濃度 ( $\mu$ g/

ml) (約 1.7ml のウサギ硝子体内に均等に拡散すると仮定した場合) を以下の本文中に記載した。

急性実験ならびに慢性実験においてそれぞれ使用した GM 硝子体内注入量と各ウサギの数を表 1, 表 2 ならびに表 3 に示す。

##### 2. 硝子体内注入法

薬剤注入前に硝子体内注入による眼圧上昇を防ぐために、まずウサギに 0.4% 塩酸オキシプロカイン (ベノキシール<sup>®</sup>, 参天製薬) による点眼麻酔を行い球結膜上より上直筋付着部を固定鉗子で固定し、角膜輪部より 1ml 用注射器に接続した 27 ゲージの注射針を前房内にその切り口を角膜側に向け約 4mm 刺入し、0.1ml の前房水を排除した。次に上直筋付着部を固定鉗子で固定したまま、1ml 用注射器に接続した 27 ゲージの注射針を用いて角膜輪部から後方約 2mm で硝子体内はほぼ中央にその切り口を水晶体側に向け刺入し、薬剤を緩徐に注入した (図 1)。一眼の硝子体内にオベガード<sup>®</sup> MA に GM を溶解した注入用薬剤 0.1ml を、他眼 (対照眼) にはオベガード<sup>®</sup> MA 0.1ml のみを注入した。

ところで、薬物を一眼の硝子体内に注入した後に眼内から排出された薬物が血中を介して他眼へ移行する可能性が考えられる。鳥崎ら<sup>21)</sup>は塩酸ロメフロキサシン (lomefloxacin hydrochloride, LFLX) をオベガード<sup>®</sup> MA に溶解し、その 0.2ml (200 $\mu$ g) を白色ウサギの一眼の硝子体内に投与し、投与後の LFLX 投与眼および非投与眼 (他眼) における各眼組織内および血清中 LFLX 濃度を測定した。その結果、投与後 72 時間までの LFLX 投与眼の硝子体中および網脈絡膜中の最高濃度 (両サンプルとも投与後 6 時間の値) はそれぞれ 14.879 $\mu$ g/ml および 15.50 $\mu$ g/g であった。また他眼 (非投与眼) における硝子体中濃度の最高値は投与後 48 時間で 0.005 $\mu$ g/ml であり、非投与眼の網脈絡膜内 LFLX 濃度は全経過中 (投与後 72 時間まで) 測定限界値以下であったという。ゆえに投与薬剤の違いはあるが一眼の硝子体内に投与された薬物が他眼の網脈絡膜に移行する割合は、投与眼網脈絡膜薬物濃度の高々 3/1,000 レベルと推測される。また Rubinstein ら<sup>22)</sup>によると臨床的に硝子体手術前に行った GM 100mg 筋肉内注射では術中採取した硝子体液中には測定限界値 (0.2 $\mu$ g/ml) 以上の GM 濃度は認められなかったという。従って対照眼網脈絡膜内 GM 濃度が GM 硝子体内投与眼の網脈絡膜内濃度の 3/1,000 レベルとすれば、本研究における硝子体内注入量は全身投与量に比し微量であることから

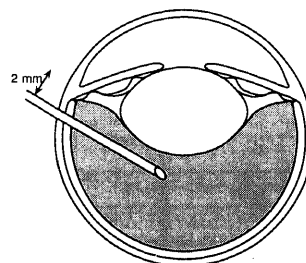


Fig. 1. Diagram of intravitreal injection. A 27-gauge needle was introduced into the vitreous cavity through the sclera 2 mm posterior to the limbus.

epithelium; RFP, rifampicin; VCM, vancomycin hydrochloride; VEP, visually evoked potential; GA 液, 2.5% グルタールアルデヒド液-0.05M リン酸緩衝液

推して対照眼の ERG に与える影響は例えあったとしても極めて少ないものと推定される。ゆえに本研究では同一個体の一眼に薬物を注入し被検眼とし、その溶媒のみを注入した他眼を対照眼として薬物の網膜におよぼす影響を検討した。

なお薬剤の硝子体内注入後(急性実験では実験終了時、慢性実験では注入後3時間の ERG 記録後)に眼底検査を行い眼底に出血あるいは網膜剝離などの注入による重篤な偶発症がないことを確認した。

### 3. 電気生理学的検査

ERG の a 波, b 波および c 波振幅値は a 波では基線から a 波の底まで, b 波では a 波の底より b 波の頂点までとし, c 波では基線から c 波の頂点までとした。OP 振幅の計測に関しては統一の見解はまだないようであり, 本研究では原則として米村ら<sup>29)</sup>の計測法を用いた。略記すると時定数 3msec で記録した OP の上向き(角膜側陽性方向)および下向き振れを, それぞれ頂点潜時の短い順に O<sub>1</sub> および O<sub>2</sub>, N<sub>1</sub> および N<sub>2</sub> と呼称する。O<sub>1</sub> 振幅は ERG 波形の a 波底から O<sub>1</sub> に到る曲線と基線との交点と N<sub>1</sub> を結ぶ直線に O<sub>1</sub> の頂点より垂線をおろしその交点までを, O<sub>2</sub> 振幅は N<sub>1</sub> と N<sub>2</sub> を結ぶ直線と O<sub>2</sub> の頂点より垂線の交点までとした。また場合によっては GM 注入後に O<sub>1</sub> 頂点が基線より下になることがあった。そのようなウサギでは GM 注入前の対照波形の計測時より O<sub>1</sub> 振幅は a 波底の頂点と N<sub>1</sub> を結ぶ直線に O<sub>1</sub> の頂点より垂線をおろしその交点までとした。

ウサギ VEP には初期陽性応答と遅発陰性徐波がみられる。初期陽性応答では個体差が小さいが, 遅発陰性徐波は種々の要因によって変化しやすいという<sup>29)</sup>。従って本研究では VEP の初期陽性応答すなわち早期成分を指標とした。ウサギ VEP の早期成分の頂点潜時には 15.1~19.5msec<sup>30)</sup>, 19~28msec<sup>31)</sup> および 30~40msec<sup>29)</sup> などの報告があり, 本研究の対照眼から導出された VEP の早期成分の頂点潜時 20~30msec はこれらの値にほぼ近似していた。

#### 1) 急性実験

塩酸ケタミン(ケタラル® 50, 三共, 東京) 20mg/kg の筋肉内注射を施し静穏を確認した後, 局所麻酔(1%塩酸リドカイン, キンロカイン® 注射液 1%, 藤沢薬品, 大阪)下で気管切開を行った。気管カニューレを挿入して人工呼吸(1回換気量 40ml, 60回/分)を行い, 塩化ツボクラリン(アメリゾール®, 吉富製薬, 大阪) 0.5mg/kg/hr 筋肉内注射により無動化し, 眼瞼および瞬膜を切除した。

ERG 記録用関電極として脳波用針電極 NE-233S(日本光電, 東京)を上方角膜に刺入し, 不関電極として銀・塩化銀電極 NT-614U(日本光電)を前頭部皮膚切開上に置いた。

刺激光として, 直流安定化電源 Xenon Arc 45(Xebex, 東京)にて点灯したキセノンアーク灯を光源とする ERG 用光刺激装置(三双製作所, 東京)を用いた。刺激光はレンズにて集光後, Y字型硝子線維束を介して両眼に送られた。硝子線維束の射出端(直径 4mm)は両眼の角膜前方約 1cm に置かれた。

刺激光の角膜面照度としては約  $5 \times 10^2$  lux または  $5 \times 10^3$  lux を用い, 各ウサギにより OP が最も観察しやすい照度を選択した。電磁シャッターにより光を断続し, 刺激光持続時間は 1sec, 刺激頻度は 0.1Hz とした。

a 波, b 波および OP を観察するには, ERG 電位を交流増幅器 AB-622M(日本光電)で増幅後に応答加算平均装置 ATAC-350(日本光電)で 5~10回加算平均した。増幅器の時定

数を a 波と b 波の観察では 2sec とし, OP 観察には 3msec とした。

また白色ウサギ 5 匹において GM 400 $\mu$ g の硝子体内注入を行い, c 波を記録した。c 波記録用関電極として, 銀・塩化銀電極 NT-614U(日本光電)を生理食塩水で満たした 10ml 注射筒の中に置き, 注射筒の先端からの白綿を角膜面上に導いた。不関電極にも同様の電極を使用し, 前頭部正中線上に置いた。c 波の観察には ERG 電位を直流増幅器 RM-5(日本光電)で増幅し, ペンレコーダー WX4401(グラフィック, 東京)で描出した。光刺激装置は左記と同じであり, 刺激光強度および持続時間はそれぞれ約 5 lux または  $5 \times 10$  lux(角膜面照度)および 5sec であった<sup>32)</sup>。

白色ウサギ 7 匹および有色ウサギ 2 匹において, ERG と同時に VEP を記録し, 白色ウサギ 1 匹(図 21 の ⊖ に対応)では VEP のみを記録した。VEP 用関電極としてコルチコ電極 Type UD(ユニークメディカル, 東京)を用い, ラムダ(lambda)の前方 6mm かつ側方 6mm の脳硬膜上<sup>33)~35)</sup>(左方および右方にそれぞれ 1 個)に置いた。VEP の不関電極として ERG と同様の銀・塩化銀電極 NT-614U(日本光電)を用い, 前頭部皮膚切開上に置いた。VEP 電位は交流増幅器 AB-622M(日本光電)で増幅され, 応答加算平均装置 ATAC-350(日本光電)で 10回加算平均された。増幅器の時定数を 2sec とした。刺激光強度, 持続時間および刺激頻度はそれぞれ約  $5 \times 10^2$  lux または  $5 \times 10^3$  lux(角膜面照度), 1sec および 0.1Hz であった。

薬剤注入前に ERG および VEP の対照波形を記録し, 注入後約 2~4 時間まで ERG あるいは VEP を観察した。成績に示す ERG および VEP 波形で上向きの振れは関電極側の陽性を意味する。なお, 以上の準備(気管切開, 電極の装着および薬剤の硝子体内注入など)は 30 分以上の暗順応後に 8 lux の赤色光下で行われた。

ここで硝子体内注入された薬剤が急性実験の測定時間内(約 2~4 時間)に少なくとも網膜外層まで到達するのであろうかという疑問が生じる。Peyman ら<sup>36)</sup>によるとウサギの硝子体内に注入された horse radish peroxidase (40mg)(分子量 40,000, 分子サイズ 25~30 Å)は注入後 15 分で網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)層の tight junction まで到達するという。従って GM の分子量(449, 463 および 477)を鑑み, 硝子体内注入された GM は急性実験の測定時間内には網膜外層まで到達し得ると推定される。

ERG では各ウサギにおける各測定時刻毎の a 波, b 波および OP の振幅ならびに頂点潜時を, c 波では振幅を, VEP では早期成分の頂点潜時を計測し, 同時刻における薬剤注入眼における値の対照眼における値に対する百分率を求め, 「成績」の

Table 1. Protocol of experiments on acute effects of intravitreal injection of GM on the ERG

Dose of GM ( $\mu$ g)	Number of Rabbits	
	Albino	Pigmented
80	4	1
240	5	2
400	8 (5)	2

Number of rabbits whose ERG was recorded with d.c. amplification is indicated in parenthesis.

項にて示す。

## 2) 慢性実験

塩酸ケタミン (ケタラル® 50, 三共) 25mg/kg 筋肉内注射 1回<sup>3)</sup>にて麻酔した。ERG 記録用電極として、ウサギ用金環埋込式コンタクトレンズ電極 (京都コンタクトレンズ, 京都) を使用した。30分以上の暗順応後に、2%メチルセルロースおよび0.4%塩酸オキシプロカイン (ベノキシール®, 参天製薬) を点眼し、コンタクトレンズ電極を両眼に装着した。これらの準備は 8 lux の赤色光下で行われた。GM 80, 160 および 240 $\mu$ g 硝子体内注入の際にそれぞれ白色ウサギ 1 匹, 3 匹および 1 匹に商用 GM (ゲンタシン® 注, シェリング・プラウ) を使用した。

5 分間の暗順応後、前述の光源からの刺激光を中性フィルターおよび吸熱フィルターを通したあと Y 字型の光学硝子線維束を介して両眼角膜の前方約 1cm に導いた。ERG 電位を交流増幅器 AB-622M (日本光電) で増幅し、FM データレコーダー NFR-3515 (SONY, 東京) に記録し、応答加算平均装置 ATAC-350 (日本光電) で 10 回加算平均した。増幅器の時定数を OP 記録では 3msec, a 波および b 波記録では 2sec とした。刺激光強度は角膜面で約  $5 \times 10^2$  lux とし、光の持続時間は 0.5 sec で刺激頻度は 1/3Hz<sup>3)</sup> とした。

原則として、ERG 記録を硝子体内注入前、注入後 2 時間、3 日目、1 週目および 2 週目に実施した。

また体重 2~3 kg の白色および有色ウサギそれぞれ 2 および 5 匹を使用し、直流増幅で c 波を記録した。ウレタン (カルバミン酸エチル, carbamic acid ethyl ester) (東京化成, 東京) 200~400mg/kg/hr の点滴静脈内注射により麻酔した<sup>39-41)</sup>。ERG 記録用電極として、銀・塩化銀電極 NT-614U (日本光電) を生理食塩水で満たした 10ml 注射筒の中に置き、注射筒の先端にシリコンチューブを接続しウサギ用に作製した開眼器にこのチューブの他端を取り付け、この先端に充填した白綿を角膜輪部に置いた。不関電極にも同様の電極を使用し、剃毛した頭頂部皮膚正中線上に置いた。ERG 電位の記録は急性実験における方法と同様である。角膜面照度約 5 lux で持続時間 5sec の単発矩形波光による b 波および c 波、ならびに角膜面照度  $5 \times 10^3$  lux で持続時間 0.5sec, 刺激頻度 1/3Hz の矩形波光による a 波および b 波を応答加算平均装置 ATAC-350 (日本光電) に記録し写真撮影した。また時定数 3msec の交流増幅器 AB-622M (日本光電) を用い OP を記録した。GM 硝子体内注入前から注入後 3 時間~28 週にわたって a 波, b 波, c 波および OP を記録した。直流増幅を用いて c 波におよぼす GM の影響を検討した実験において使用した GM 硝子体内注入量とウ

サギの数および種類は、GM 80 $\mu$ g では白色ウサギ 1 匹および有色ウサギ 2 匹, GM 200 $\mu$ g では白色ウサギ 1 匹および有色ウサギ 3 匹であった (表 2)。

ERG 波形は刺激および記録条件を一定に保っても記録時毎の電極の位置、電極と生体間の電気抵抗、動物の全身状態などの些細な差異によっても影響を受け得る<sup>42-44)</sup>。長期的に ERG を記録する際、ERG 波形に変化を来し得る諸因子の影響を完全に排除することは不可能であり、慢性的 ERG 記録実験においては ERG の変動に対する有意性の判定が問題となる。また ERG の個体内変動 (日内変動, 日差変動など) を避けることは出来ない。そこで本研究では日内変動の影響をなるべく少なくするために ERG 記録を 1 日のうち一定時間帯 (午後 2~6 時) に行った。Lawwill<sup>45)</sup> はウサギ ERG (a 波および b 波振幅) 日差変動を検討し、同一眼の日差変動が左右眼の間での相違よりも大きいので、ウサギ ERG 変化を長期にわたって観察するには一眼を被検眼とし他眼を対照として左右眼で比較することが適切であると判断した。ゆえに本研究では ERG 変化について、左右眼で比較検討を行った。すなわち硝子体内注入前および注入後の各測定時点に記録された対照眼の a 波, b 波, c 波および OP の振幅を 100% とし、薬剤注入眼のそれぞれの振幅変化を次式の如く百分率で表示した<sup>45)</sup>。

$$\frac{\text{薬剤注入眼の振幅}}{\text{対照眼の振幅}} \times 100$$

Zachary ら<sup>46)</sup> は b 波振幅が対照眼の振幅の平均値の 86% 以下を減少と判定した。本研究での各波形の振幅変化に対する有意性の判定基準として Zachary らの報告<sup>46)</sup> 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 b 波振幅変化の程度が  $\pm 20\%$  以内のものは有意とみなさなかつた。なお、薬剤注入眼の振幅の計測が不可能な場合には、百分率 0 と表示した。また a 波, b 波および OP の頂点潜時において同様な百分率を求め検討し、薬剤注入眼の頂点潜時の計測不可能な際には測定不能と記載した。

また GM 80 $\mu$ g 硝子体内注入では有色ウサギ 1 匹で注入後 4 週目に、200 $\mu$ g 注入では有色ウサギ 1 匹で注入後 16 週目に、それぞれ急性実験と同様に気管切開を施し塩化ツボクラリンの筋肉内注射にて無動化し、VEP を記録した。

## 4. 眼底撮影および蛍光眼底造影

瞳孔は、0.5% トロピカミドと 0.5% 塩酸フェニレフリンの点眼により十分に散大された。GM 80 $\mu$ g および GM 200 $\mu$ g を注入した有色ウサギそれぞれ 1 および 3 匹で注入前ならびに注入後 2~4 週目に眼底撮影および蛍光眼底造影を行った。使用し

Table 2. Protocol of experiments on chronic effects of intravitreal injection of GM on the ERG

Dose of GM ( $\mu$ g)	Number of Rabbits	
	Albino	Pigmented
80	5 (1)	4 (2)
160	5	
200	1 (1)	3 (3)
240	4	

Number of rabbits whose ERG was recorded with d.c. amplification is indicated in parenthesis.

Table 3. Protocol of experiments on histological effects of intravitreal injection of GM

Dose of GM ( $\mu$ g)	Number of Eyes	
	Albino	Pigmented
80	1	2 (1)
200	1	
400	1 (1)	1
800		1

Number of eyes enucleated 4 hr after injection is indicated in parenthesis.

た眼底カメラは TOPCON TRC-W (トプコン, 東京) であった。蛍光眼底造影に際してはウサギ耳静脈より10%フルオレセイン (フルオレサイト<sup>®</sup> 注射液1号, 日本アルコン, 東京) (0.1ml/kg)<sup>40</sup> を静脈内注射した。

#### 5. 組織学的検査法

白色ウサギ3匹および有色ウサギ4匹を用いた (表3)。有色ウサギ1匹 (GM 80 $\mu$ g 注入) および白色ウサギ1匹 (GM 400 $\mu$ g 注入) では硝子体内注入後4時間目に ERG 記録後に眼球を摘出した。他のウサギでは全て注入後2週目に眼球を摘出した。そのうち400および800 $\mu$ g 硝子体内注入では ERG の消失を確認後に眼球を摘出した。ウサギ硝子体内に2.5%グルタルアルデヒド液-0.05M リン酸緩衝液 (GA 液) (pH 7.2~7.4) (0.2ml) を注入した後に, ペントバルビタール (ネンブタール<sup>®</sup>, 大日本製薬, 大阪) 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 GA 液に1分間浸漬した後に, 眼球の赤道面に沿って剖面 (1カ所) を入れ, さらに15分間浸漬固定した後に, 眼球を二分し, 10%ホルマリン液中に固定・保存した。次にエタノール系列にて脱水し, パラフィン包埋を行い, 5 $\mu$ m に薄切してヘマトキシリン・エオジン染色を施し光学顕微鏡にて観察した。

#### II. 眼内クリアランス (硝子体内注入法)

体重 2~3 kg の白色ウサギ13匹26眼を用いた。実験に使用した薬剤は GM (力価 627 $\mu$ g/mg, シェリング・プラウ) の研究用原末であった。正常ウサギの両眼に硝子体内注入をほぼ同時に施行した。硝子体内注入法は前述したように角膜輪部から約2mm 後方の部位で27ゲージ針を硝子体中央に刺入し, GM 80 $\mu$ g を含む0.1ml のオベガード<sup>®</sup> MA を緩徐に注入した。ウサギ眼の硝子体容積を1.7ml と仮定し硝子体中に GM が均等に拡散したとすると, この注入量では GM の硝子体内濃度は約47 $\mu$ g/ml となる。硝子体内注入後12, 24, 48および72時間後に眼球を摘出し, 摘出眼球を直ちに生理食塩水にて洗浄し眼球に付着した血液成分などを除去し濾紙にて水分を吸着後, 1ml 用注射器に接続した26ゲージの注射針を輪部より刺入し角膜, 虹彩および水晶体に注射針先端が触れないように注意して, 約0.15ml の前房水を採取した。約1ml の硝子体液を輪部より約3mm の位置で2.5ml 用注射器に接続した18ゲージの注射針を硝子体内ほぼ中央に向かって刺入し採取した。またはほぼ同時に心腔内より約5ml の動脈血を採取した。血液を可及的速やかに3,000rpm で10分間遠心し, 血清を分離した。採取した前房水, 硝子体液および血清を密封した採血管内に入れ, 低温 (2~8 $^{\circ}$ C) で保存し, 全検体を一括して測定した。なお各測定時点について6ないし8眼を用いた。

GM 濃度はエンザイムイムノアッセイ (EMIT<sup>®</sup> gentamicin assay, 第一化学薬品, 東京) により測定された<sup>41</sup>。EMIT<sup>®</sup> 法はホモジニアスエンザイムイムノアッセイを利用している。測定原理としてはまず酵素で標識した薬剤および試料中の薬剤と, その薬剤に対する抗体との間で競合的に抗原抗体反応を起こさせる。抗体と結合しなかった薬剤の標識酵素活性は, 試料中の薬剤濃度と相関するので, 標識酵素活性を分光光度計を用いて測定することにより薬剤濃度が定量される。測定装置として自動サンプル採取および希釈分注機 (シバピペッタ・ダイリユータ, PD-1500, シバ, カリフォルニア, 米国), 分光光度計 S-III (シバ) (波長 340nm, 30 $^{\circ}$ C), データ処理装置 (シバクリニカル・プロセッサ, CP-5000, シバ) を使用した。EMIT<sup>®</sup> 法の

GM 測定限界値は 1.0 $\mu$ g/ml であった。測定に先立ってウサギ血清, 前房水あるいはオベガード<sup>®</sup> MA に既知濃度の GM を加えたものを用い, これらが GM 測定結果におよぼす影響を検討し, ウサギ血清, 前房水あるいはオベガード<sup>®</sup> MA が EMIT<sup>®</sup> 法による濃度測定に影響しないことを確認しておいた。

測定値を平均値±標準偏差 (mean±S.D.) で表示した。また検体採取各時間ごとに前房水中濃度 ( $C_w$ ) と硝子体中濃度 ( $C_v$ ) の比 ( $C_w/C_v$ ) を求め, 2群間の平均値の有意差検定には対応のない標本の t 検定を用い, 危険率5%以下を有意差ありと判定した。

#### III. 2回硝子体内注入

実験的細菌性眼内炎の罹患眼では薬剤の眼内からのクリアランスが促進されるとの報告<sup>40</sup>があり, 細菌性眼内炎の治療においては薬剤の再注入が必要となる可能性がある。そこで薬剤の再注入の網膜におよぼす影響についても検討した。しかし再注入では網膜への薬剤毒性のみならず水晶体および網膜に対する機械的損傷などの危険性が増加するので, 再注入の際には初回注入にまして慎重に硝子体内注入を行った。硝子体内注入法は前述と同様であるが, 2回目の硝子体内注入では初回の硝子体内注入部位を避け, 例えば初回に上耳側より行えば2回目では上鼻側と象限を変更して注入した。また実験IIの眼内クリアランス結果および GM のクリアランスに関する諸家の報告<sup>51, 52</sup>を参照すれば, 硝子体中および前房水中の GM 濃度がそれぞれ約10 $\mu$ g/ml および約2 $\mu$ g/ml 未満より低下する時期は注入72時間後と推測されるので, 初回注入後3日目において, ERG の記録後に初回注入とほぼ同時刻に2回目注入として初回注入と同じく GM 80 $\mu$ g を硝子体内へ注入した。

有色ウサギ4匹および白色ウサギ4匹を使用した。ERG 記録法は前述と同様である。ERG 記録用電極として白色ウサギ2匹では金環埋込式コンタクトレンズ電極 (京都コンタクトレンズ) を, 残り6匹では前述の如く注射器を利用した銀・塩化銀電極 NT-614U (日本光電) を使用した。ERG 記録の際の麻酔としてコンタクトレンズ電極の使用の際には塩酸ケタミン (25mg/kg) を用い, 他の電極を用いた際にウレタン (200~400mg/kg/hr) を用いた。再注入後の ERG 観察は原則として初回注入後1~8週目に行った。有色ウサギ1匹 (図42~45の▲に対応) では再注入後2時間目に ERG を記録した。

GM 初回硝子体内注入後4週目に, 有色ウサギ1匹および白色ウサギ1匹において ERG および VEP を記録後に眼球摘出を行い, 前述の如く固定, 脱水, 包埋を行い組織学的に検索した。また有色ウサギ3匹において再注入後4日目に眼底撮影および蛍光眼底造影を施行した。

#### IV. 硝子体切除眼における検討

体重 2~3 kg の白色ウサギ30匹および有色ウサギ8匹を使用した。眼内灌流液には BSS plus<sup>®</sup> (アルコン, テキサス, 米国) を使用した。硝子体内注入および灌流液に添加した GM には研究用原末 (力価 630 $\mu$ g/mg, シェリング・プラウ) を用い, 全身投与の際にはゲンタシン<sup>®</sup> 注 (40mg 力価, シェリング・プラウ) を用いた。また硝子体切除および水晶体切除に先立ち, 瞳孔は0.5%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリン (ミドリ<sup>®</sup> P, 参天製薬) の点眼により十分に散大された。

##### 1. 硝子体手術方法

ケタラール<sup>®</sup> 50 (三共) およびキシラジン (セラクター<sup>®</sup> 2%

注射液, バイエル, レバークーゼン, ドイツ) の7:1の混合液0.5~1 ml/kgの筋肉内注射によって全身麻酔<sup>53)</sup>を行い, 四肢および頭部を固定した. その後1%塩酸リドカイン(約1 ml)にて球後注射を行い, 眼球を前方に脱臼させ, 硝子体手術を開始した. まず手術顕微鏡下で切開予定の強膜創に対応した部位の結膜を切開し, 角膜輪部から約2 mmの強膜2か所にマイクロビトレオレチナルブレード(アルコン)で小切開を加え, 一方にはインフュージョンニードルを5-0ダクロン(日本レダリー, 東京)を用い縫着(右眼の場合9時方向, 左眼の場合は3時方向)して眼内灌流液を流し, 他方の切開創から硝子体切除器具(オキュトーム<sup>®</sup>, バークレイ, カリフォルニア, 米国)を眼内に挿入し(ほぼ6時方向から), 水晶体に接触しないよう留意しながら出来るかぎり硝子体を切除した後(図2), 器具を抜き去り7-0バイクリル(ジョンソン・エンド・ジョンソンメディカル, 東京)を用い強膜創を閉じ, 次にインフュージョンニードルを除去し同様の縫合糸を用い創を閉じた. 術直後に著しく低眼圧であった場合には同様の灌流液を眼内に追加注入し, 眼圧を調整した. 結膜切開創を7-0バイクリル(ジョンソン・エンド・ジョンソンメディカル)で閉じた. 手術は全て同一術者(著者)により行われ, 一眼についての硝子体切除時間は約10分間, 眼内灌流量は約50 mlであった. 灌流液の温度を20~24℃とした. 硝子体手術の際には硝子体手術用コンタクトレンズを使用し, 手術顕微鏡の同軸照明のみで眼底を観察しながら手術を行い, 眼内照明を用いなかった.

## 2. 硝子体切除眼へのGM硝子体内注入

両眼の硝子体切除4週間後に行った検眼鏡検査およびERG検査にて異常がみられなかったウサギ(白色3匹, 有色2匹)を使用した. 硝子体内注入法は前述の1回硝子体内注入実験と同様で, 片眼の硝子体内にGM 80 $\mu$ gを注入し他眼にはオベガード<sup>®</sup> MAのみを注入した(図3).

ERG記録法は前述と同様である. ERG記録用電極として前述の如く注射器を利用した銀・塩化銀電極 NT-614U(日本光電)を使用した. ERG記録の際の麻酔としてウレタン(東京化

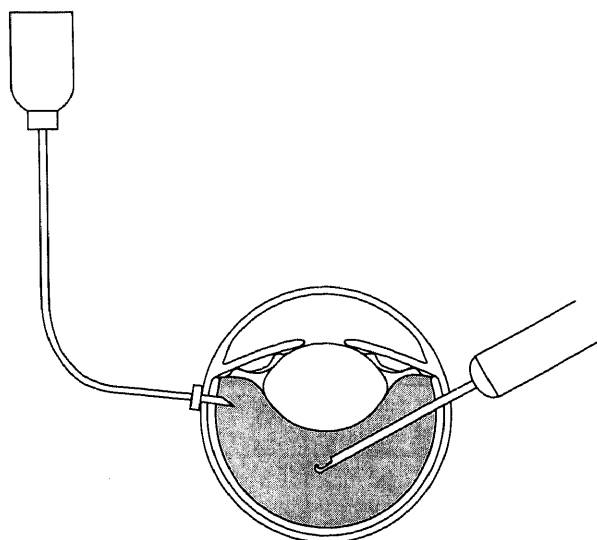


Fig. 2. Diagram of vitrectomy. An infusion cannula and Ocutome<sup>®</sup> probe (vitreous suction and cutter) were introduced into the vitreous body through the sclera 2 mm posterior to the limbus.

成)(200~400 mg/kg/hr)を用いた. ERG記録を硝子体内注入後3時間~4週目まで行った.

GM硝子体内注入後4週目に, 有色ウサギ1匹および白色ウサギ1匹においてERGおよびVEPを記録後に眼球摘出を行い, 前述の如く固定, 脱水, 包埋を行い組織学的に検索した.

## 3. 眼内灌流液中へのGM添加

硝子体切除術前に行った検眼鏡検査およびERG検査にて異常がみられなかったウサギを使用した. GM灌流液濃度は20

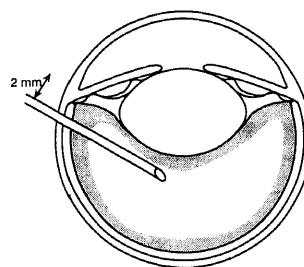


Fig. 3. Diagram of intravitreal injection more than 4 weeks after vitrectomy. A 27-gauge needle was introduced into the midvitreous cavity through the sclera 2 mm posterior to the limbus.

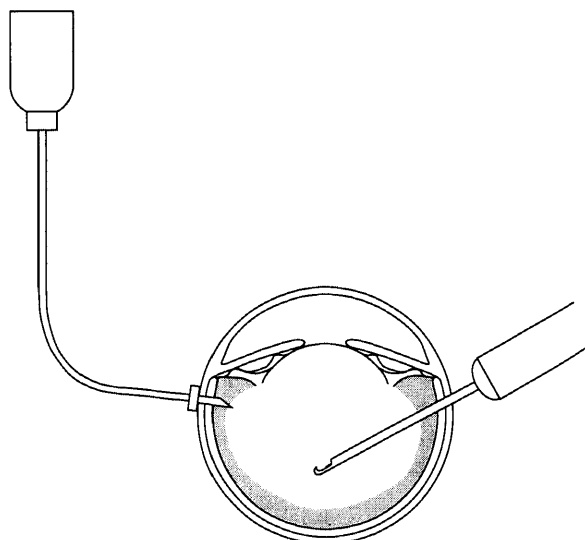


Fig. 4. Diagram of lensectomy and vitrectomy. After lensectomy by Fragmatome<sup>®</sup> (instrument for phacoemulsification), an infusion cannula and Ocutome<sup>®</sup> probe (vitreous suction and cutter) were introduced into the vitreous body through the sclera 2 mm posterior to the limbus.

Table 4. Protocol of experiments on effects of a GM-containing irrigation solution on the ERG

GM Concentration ( $\mu$ g/ml)	Number of Rabbits	
	Albino	Pigmented
20		4
50	5 (4)	2

Number of lensectomized and vitrectomized rabbits is indicated in parenthesis.

(有色ウサギ4匹) および50(有色ウサギ2匹, 白色ウサギ5匹)  $\mu\text{g/ml}$  であった(表4)。GM  $50\mu\text{g/ml}$  灌流の際, 白色ウサギ4匹において硝子体切除術の他に水晶体切除術も行った。水晶体切除術にはフラグマトーム<sup>®</sup>(パークレイ, カリフォルニア, 米国)を用いた。水晶体切除法は硝子体切除術のみと基本的にはほとんど同様であったが, 略記すれば手術顕微鏡下で角膜輪部から約2mmの強膜に小切開を加え, インフュージョンニードルを縫着(右眼では9時方向, 左眼では3時方向)した後, 角膜輪部より約2mmで右眼では1時方向, 左眼では7時方向に切開を加えフラグマトーム<sup>®</sup>(パークレイ)のチップを挿入し水晶体切除を行った。その際に水晶体前囊は除去せず, 術後の前囊混濁を予防するために水晶体前囊上皮を硝子体切除器具を用い吸引除去した。その後同部位より硝子体切除器具を眼内に挿入し出来るかぎり硝子体を切除して強膜創を閉じた(図4)。水晶体切除には約1分を要し, 全手術時間は約11分であった。術直後に著しく低眼圧であった場合には, 同じ灌流液を眼内に追加注入した。

ERGを1週ごとに手術後4週目まで記録した。硝子体手術後4週目に一部のウサギ(GM  $20\mu\text{g/ml}$  では有色ウサギ3匹, GM  $50\mu\text{g/ml}$  では有色ウサギ1匹および白色ウサギ2匹)では前述の気管切開を施し人工呼吸下でVEPを記録し, ついで眼球を摘出し網膜を組織学的に検討した。

眼内灌流液に添加した薬剤が網膜におよぼす影響を特に硝子体切除術が行われた眼において論じる際には種々の因子の関与<sup>5153</sup>を考慮せねばならないので, 手術後早期に記録されたERG結果の判定は非常に難しい。Moorheadら<sup>50</sup>は有色ウサギにおいて角膜輪部から後方6mmで網膜冷凍凝固を行い, 凝固後2週目に同部位に作製した小切開より挿入した硝子体切除

器によって硝子体切除術を施行し, 各種眼内灌流液(生理食塩水, BSS<sup>®</sup>, BSSplus<sup>®</sup>)が網膜におよぼす影響をERG(b波)および組織学的所見を指標として検討した。硝子体切除時間は約10分間, 眼内灌流量は約50mlであり, 眼内灌流液の温度は $21^{\circ}\text{C}$ であった<sup>56</sup>。彼ら<sup>56</sup>によると, BSSplus<sup>®</sup>(アルコン)を使用した場合には, 術直後あるいは術翌日に記録したb波振幅は術前の85~90%に減少したが, 術後2日目にはほぼ術前の振幅(98~100%)に回復したという。Declercqら<sup>57</sup>は白色ウサギにおいて22ゲージ針にて強膜穿孔後0.02mlの生理食塩水を硝子体内に注入しERG変化を観察した。その結果, 注入後2日目までa波およびb波振幅はそれぞれ注入前の20~52%および24~32%に減少したが, 1週目までには注入前の振幅に回復したという。ゆえに彼らの報告<sup>56,57</sup>から, 本研究では硝子体切除術

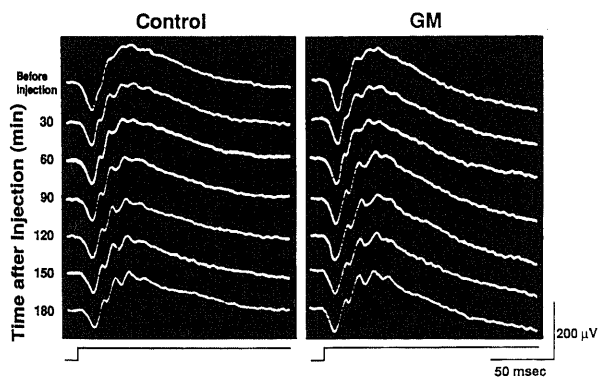


Fig. 5. Effects of an intravitreal injection of  $80\mu\text{g}$  GM on an albino rabbit ERG in vivo. The a- and b- waves were not deteriorated. Each trace shows the averaged waveform of 10 responses. Right column shows responses from the eye which was injected with antibiotics to be tested; left column shows responses from the control fellow eye which received only the solvent (Opeguard<sup>®</sup>-MA) in this figure and Figs. 6, 7. Time constant, 2 sec. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. Stimulus frequency and duration were 0.1 Hz and 1 sec, respectively. Positivity upwards in all records in the present paper. Rectangular waveforms at the bottom indicate the onset (upward deflection) and termination (downward deflection) of stimulus light in this figure and all other figures showing the ERG or VEP. Numerals left to ERG waveforms denote time after injection (minutes).

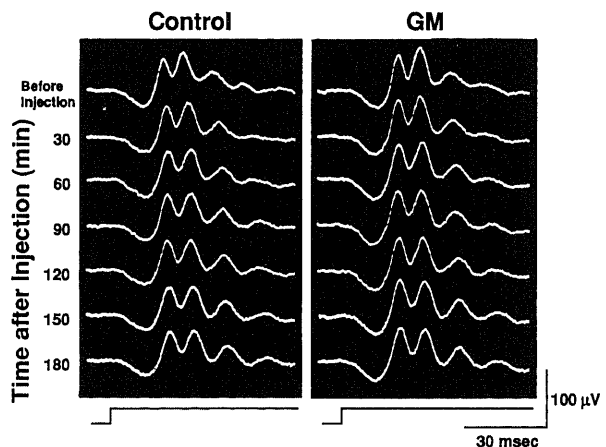


Fig. 6. Effects of an intravitreal injection of  $80\mu\text{g}$  GM on the oscillatory potential of an albino rabbit in vivo. The oscillatory potential was not deteriorated. Responses from the same rabbit as in Fig. 5. Time constant, 3 msec. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. For other recording parameters see the legend for Fig. 5.

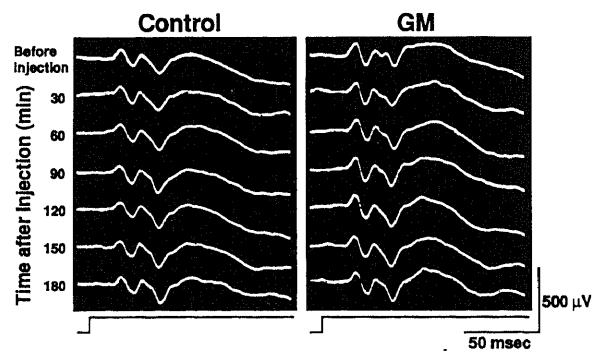


Fig. 7. Effects of an intravitreal injection of  $80\mu\text{g}$  GM on the VEP of a pigmented rabbit in vivo. The latency of the initial positive responses of the VEP remained unchanged. Each trace shows the averaged waveform of 10 responses. The right and left columns show the responses to the stimulation of the GM-injected eye and the control fellow eye respectively. Time constant, 2 sec. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. Stimulus frequency and duration were 0.1 Hz and 1 sec, respectively. The VEP was monopolarly recorded through an active electrode placed on the contralateral dura mater (visual area I, 6 mm anterior to the lambda and 6 mm lateral to the median line). Numerals left to VEP waveforms denote time after injection (minutes).



後1週未満での ERG を記録せず有意性の判定に使用しなかった。また手術時に使用した麻酔薬(塩酸ケタミンおよびキシラジン)および術後早期に ERG 記録した場合の麻酔薬(ウレタン)のウサギの全身状態におよぼす影響<sup>39)~41)88)89)</sup>を鑑み、硝子体切除術後の ERG 記録は術後1週目以降とした。その有意性の判定法は硝子体内注入の慢性実験(1-3-2)における判定法と同様であった。

4. 無処置眼, 硝子体切除眼または硝子体および水晶体切除眼への GM 移行性の検討

白色ウサギ22匹を使用した。硝子体および水晶体切除方法は前述の方法と同じである。

白色ウサギ4匹(硝子体切除眼4眼, 硝子体および水晶体切除眼4眼)では手術終了直後に, 4匹(硝子体切除眼4眼, 硝子体および水晶体切除眼4眼)では手術翌日に, 5匹(硝子体切除眼5眼, 硝子体および水晶体切除眼4眼)では手術1週間後に, そして4匹(硝子体切除眼4眼, 硝子体および水晶体切除眼4眼)では手術4週間後に GM 5mg/kg を大腿筋に筋肉内注射した。GM 投与に先立ち, 術後翌日, 1週間および4週間後のそれぞれにおいて行った前眼部および眼底の検査において異常がないことを確認した。また無処置眼(白色ウサギ5匹, 5眼)においても同様に眼底に異常のないことを確認後に GM 5mg/kg を大腿筋に筋肉内注射した。前述の眼内クリアランス実験と同様に, GM 筋肉内注射1時間後に眼球を摘出して前房水および硝子体を採取した。ほぼ同時に心腔内より血液を採取し血清を分離して, 前房水および硝子体とともに-80℃にて凍結保存し, その GM 濃度を測定した。

濃度測定には蛍光偏光免疫法, TDX(ダイナボット, 東京)を使用した。その測定限界値は0.3μg/mlであった。

測定値を, 平均値±標準偏差(mean±S.D.)で表示した。また測定限界値以下の値は ND (not detectable) と表示した。2群間の有意差検定には Wilcoxon 順位和検定を用い, 危険率5%以下を有意差ありと判定した。また検定に際しては ND の値は0とみなした。

成 績

1. 急性実験

1. GM 80μg (約 47μg/ml) (白色ウサギ4匹および有色ウサギ1匹)

a 波と b 波の振幅および頂点潜時には対照眼, GM 注入眼ともほとんど変化はみられなかった [図5 (図11Aと12Aの▽に

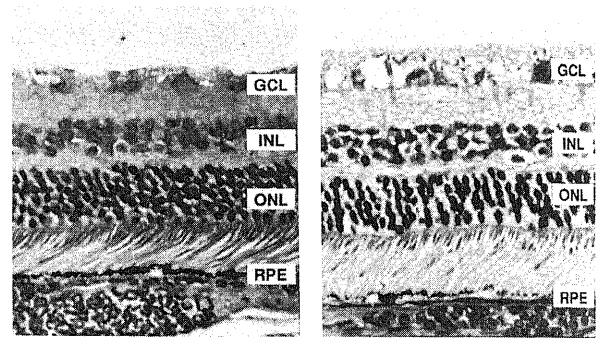


Fig. 8. Light micrograph of the retina of a pigmented rabbit 4 hr after intravitreal injection of 80 μg GM. Left, control retina. Right, the retina of the GM-injected eye. Hematoxylin-eosin stains. Magnification, ×200. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium.

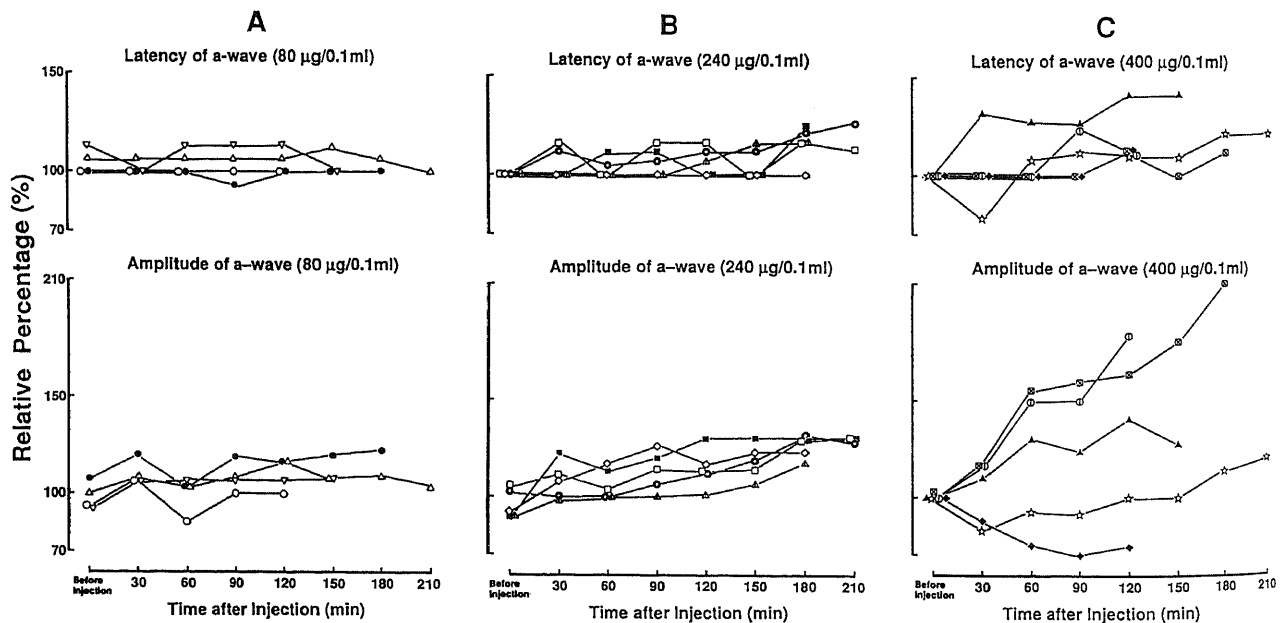


Fig. 9. Changes of the latency and amplitude of the a-wave induced by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. The dose of intravitreal injection of GM was 80 μg, 240 μg and 400 μg in graphs A, B and C, respectively. The ratios of the latencies and amplitudes in the tested eye to those in the control fellow eye, (tested eye/control fellow eye) ×100 (%), are plotted against time before and after injection in all graphs throughout the present paper. The filled symbols indicate pigmented rabbits, and others indicate albino rabbits in all graphs throughout the present paper. Stimulus intensity was 5×10<sup>2</sup> lux at the cornea in the symbols of ○, ● in graph A, □, ◇, △, ■ in graph B and ▲ in graph C, and 5×10<sup>2</sup> lux at the cornea in the other symbols in this figure and Fig. 10. The same symbols indicate the same rabbits in this figure and Figs. 10, 11, 12, 13, 14, 21.

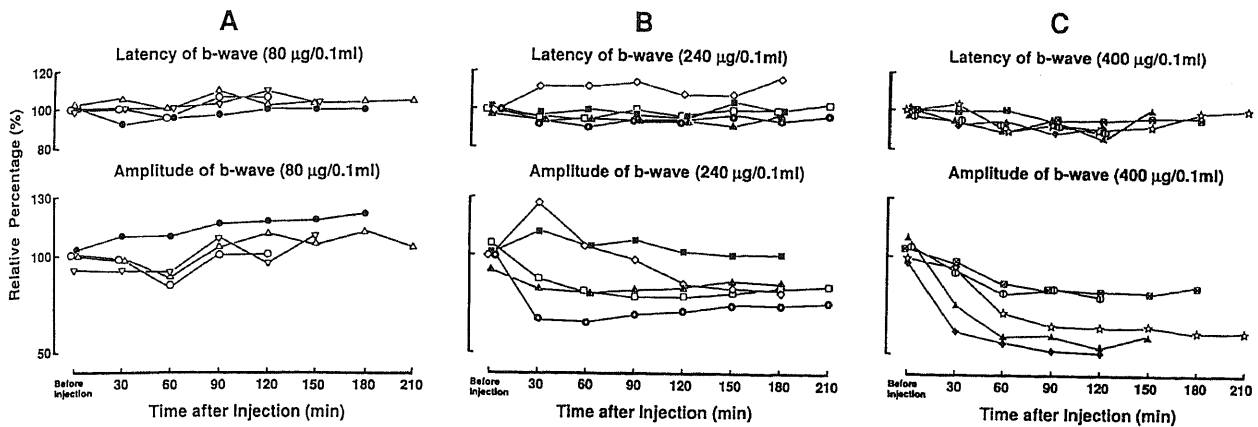


Fig. 10. Changes of the latency and amplitude of the b-wave by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 9.

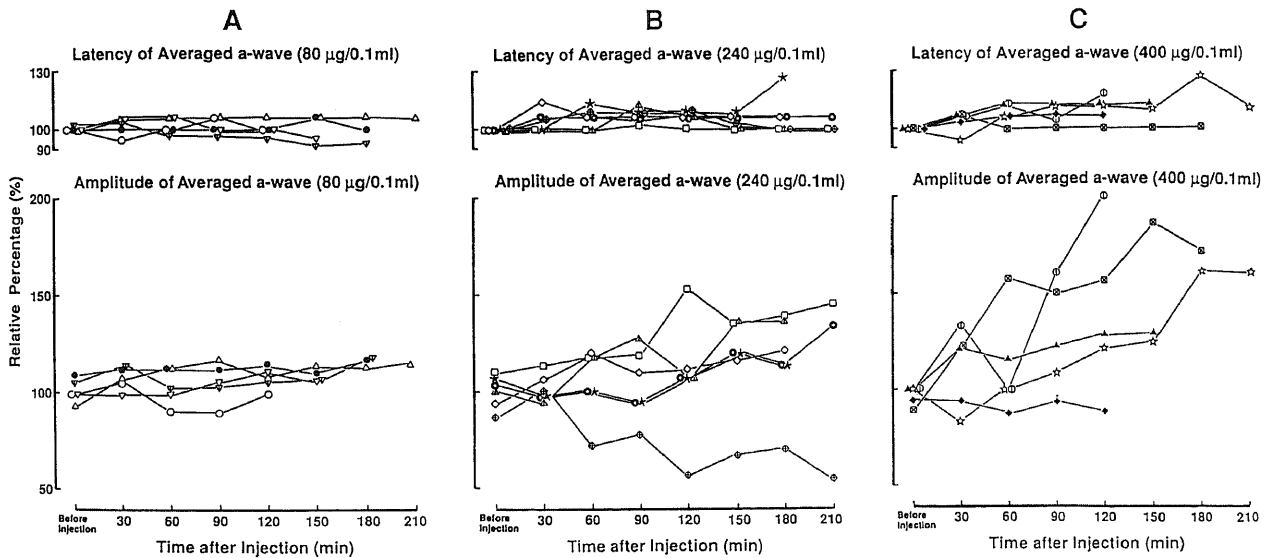


Fig. 11. Changes of the latency and amplitude of the averaged a-wave by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea in the symbol of  $\star$  in graph B, and  $5 \times 10^2$  lux at the cornea in the symbol of  $\nabla$  in graph A and  $\diamond$  in graph B in this figure and Figs. 12. Other conditions were the same as in Fig. 9.

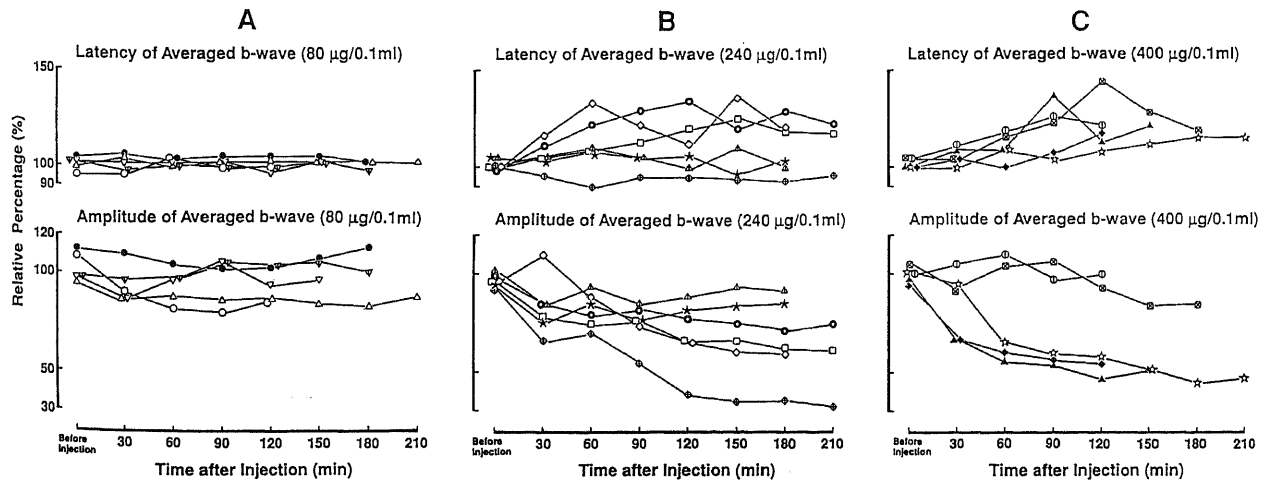


Fig. 12. Changes of the latency and amplitude of the averaged b-wave by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Figs. 9 and 11.

対応), 図9A, 10A, 11A, 12A]. OPの振幅および頂点潜時においても対照眼およびGM注入眼ともにほとんど変化は認められなかった[図6(図13Aと14Aの▽に対応), 図13A, 14A]. 調べた2匹のVEPの早期成分の頂点潜時には対照眼とGM注入眼との間で明らかな差はみられなかった[図7(図21Aの●に対応), 図21A].

硝子体内注入後4時間に採取した網膜の組織学的所見には特に異常はみられなかった(図8).

2. GM 240 $\mu$ g (約 141 $\mu$ g/ml) (白色ウサギ5匹および有色ウサギ2匹)

GM注入眼では対照眼に比し注入後2時間においてa波振幅は軽度増加し(単発波形:平均114%, 加算波形:平均107%), その頂点潜時は軽度延長した(単発波形:平均107%, 加算波形:平均105%) (図9B, 11B). GM注入眼では対照眼に比し注入後2時間においてb波振幅は低下し(単発波形:平均84%, 加算波形:平均70%), その頂点潜時は加算波形において若干の延長傾向を示した(平均111%) (図10B, 12B). GM注入眼では対照眼に比し注入後2時間においてOP振幅は

低下した(O<sub>1</sub>:平均66%, O<sub>2</sub>:平均87%)が, その頂点潜時はほとんど変化しなかった(図13B, 14B).

調べた4匹のVEPの早期成分では対照眼とGM注入眼との間で明らかな差はみられなかった(図21B).

3. GM 400 $\mu$ g (約 235 $\mu$ g/ml) (白色ウサギ8匹および有色ウサギ2匹)

GM注入眼では対照眼に比し注入後2時間においてa波振幅は増加し(単発波形:平均132%, 加算波形:平均139%), その頂点潜時は延長した(単発波形:平均118%, 加算波形:平均109%) [図15(図9Cの☆に対応), 図9C, 11C]. GM注入眼では対照眼に比し注入後2時間においてb波振幅は低下し(単発波形:平均66%, 加算波形:平均71%), その頂点潜時は延長した(加算波形:平均123%) [図15(図10Cの☆に対応), 図10C, 12C]. GM注入眼では対照眼に比し注入後2時間においてOPのO<sub>1</sub>およびO<sub>2</sub>振幅は低下(O<sub>1</sub>:40~75%; 図13C下の○・▽・☆, O<sub>2</sub>:70および79%; 図14C下の○および▽) [図16(図13C下と図14C下の○に対応)]あるいは反対に増大し(O<sub>1</sub>:150%; 図13C下の☒, O<sub>2</sub>:113~146%; 図14C下の☆・▲・

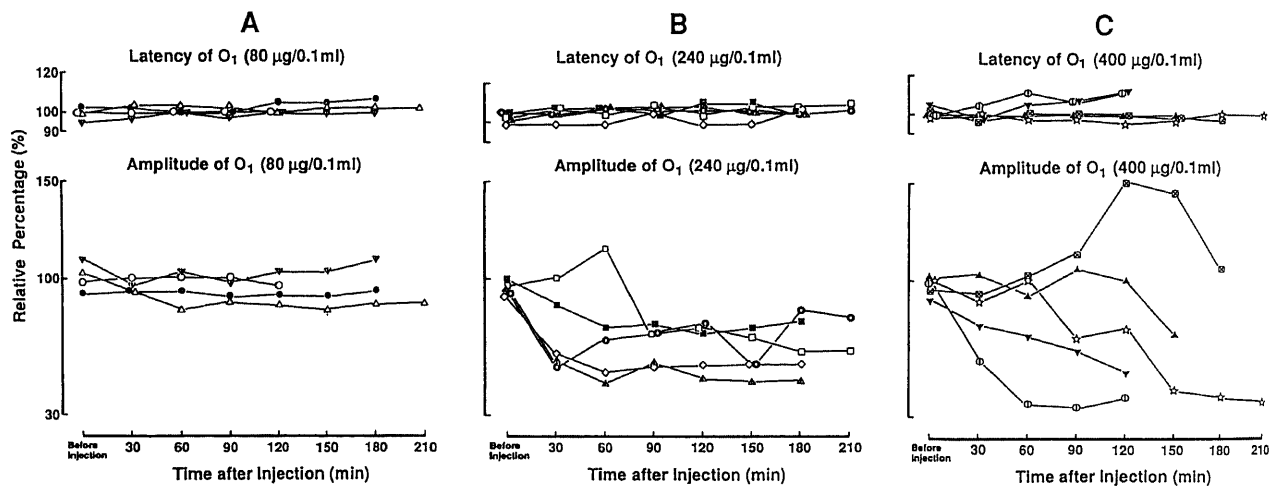


Fig. 13. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential (O<sub>1</sub>) by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea in the symbol of ▼ in graph C, and  $5 \times 10^2$  lux at the cornea in the symbol of ▽ in graph A in this figure and Fig. 14. Other conditions were the same as in Fig. 9.

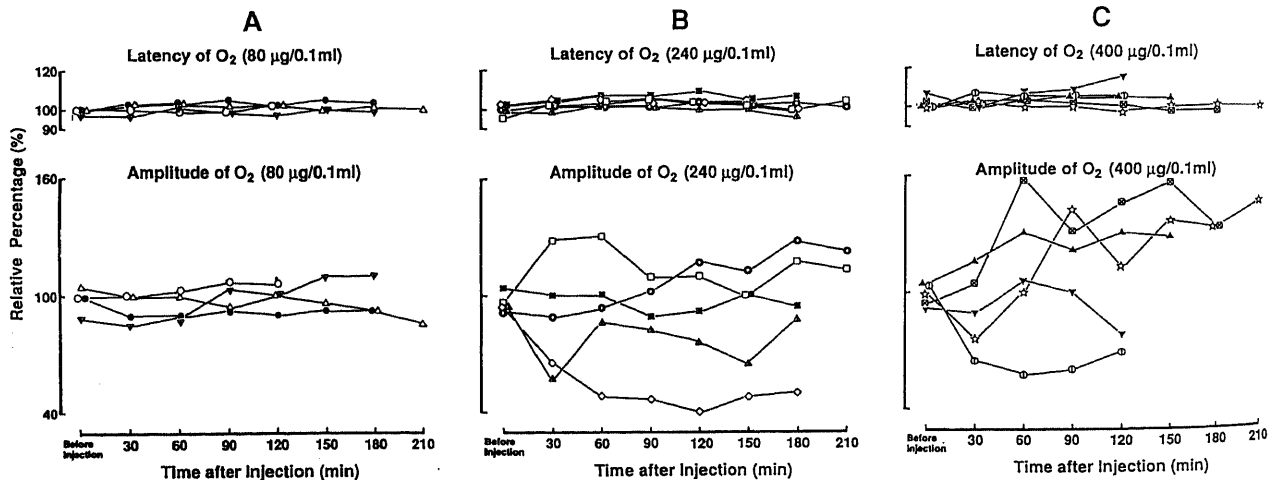


Fig. 14. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential (O<sub>2</sub>) by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Figs. 9 and 13.

図10), 一定傾向はみられなかった. GM 注入眼では対照眼に比して注入後2時間において O<sub>1</sub>頂点潜時は2匹(111および112%; 図13C上の○および▼)[図16(図13C上の○に対応)], O<sub>2</sub>頂点潜時では1匹(115%; 図14C上の▼)において軽度に延長したが, 他のGM 注入眼ではほとんど変化しなかった(図13C上, 14C上).

GM 注入眼では対照眼に比して注入後2時間においてb波頂点潜時はほとんど変化しなかった(図18上)が, b波振幅は著明に減少し(硝子体内注入後2時間30分において平均59%) (図18中), c波振幅は増大あるいは減少と一定した傾向を示さなかった[図17(図18下の□に対応), 図18下].

VEPの早期成分に関しては注入後2時間で調べた4匹中2匹で対照眼刺激に比しGM 注入眼刺激では頂点潜時に軽度の延長傾向(113および123%; 図21Cの▲および⊖)が認められ

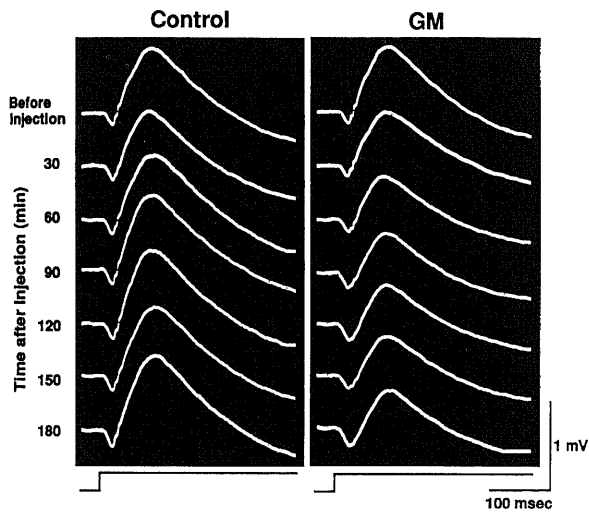


Fig. 15. Effects of an intravitreal injection of 400 µg GM on an albino rabbit ERG in vivo. The b-wave was suppressed by 400 µg GM. The peak latency of the b-wave was almost unchanged. A single rectangular stimulus light was used. Time constant, 2 sec. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. Stimulus duration, 1 sec. For other recording parameters see the legend for Fig. 5.

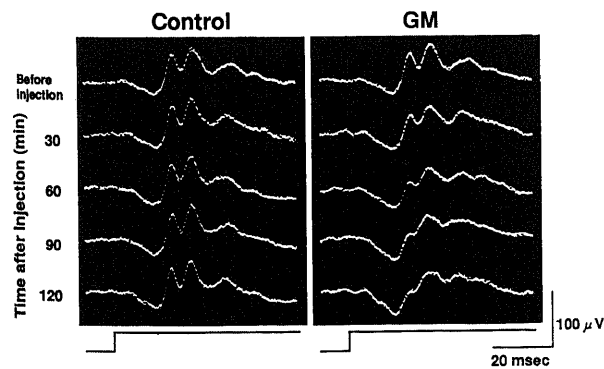


Fig. 16. Effects of an intravitreal injection of 400 µg GM on the oscillatory potential on an albino rabbit ERG in vivo. The oscillatory potential was diminished by 400 µg GM. The peak latency of the oscillatory potential remained nearly unchanged. Time constant, 3 msec. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. For other recording parameters see the legend for Fig. 5.

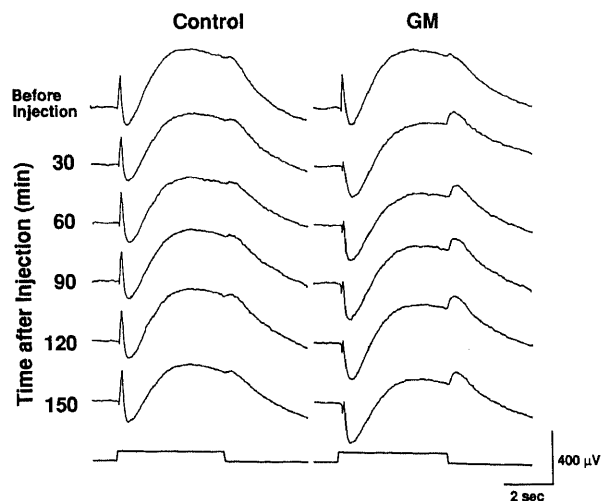


Fig. 17. Effects of an intravitreal injection of 400 µg GM on the ERG of an albino rabbit. The b-wave was markedly suppressed. The c-wave was not greatly deteriorated. A single rectangular stimulus light was used. Direct-coupled amplification. Stimulus intensity,  $5 \times 10$  lux at the cornea. Stimulus duration, 5 sec. For other recording parameters see the legend for Fig. 5.

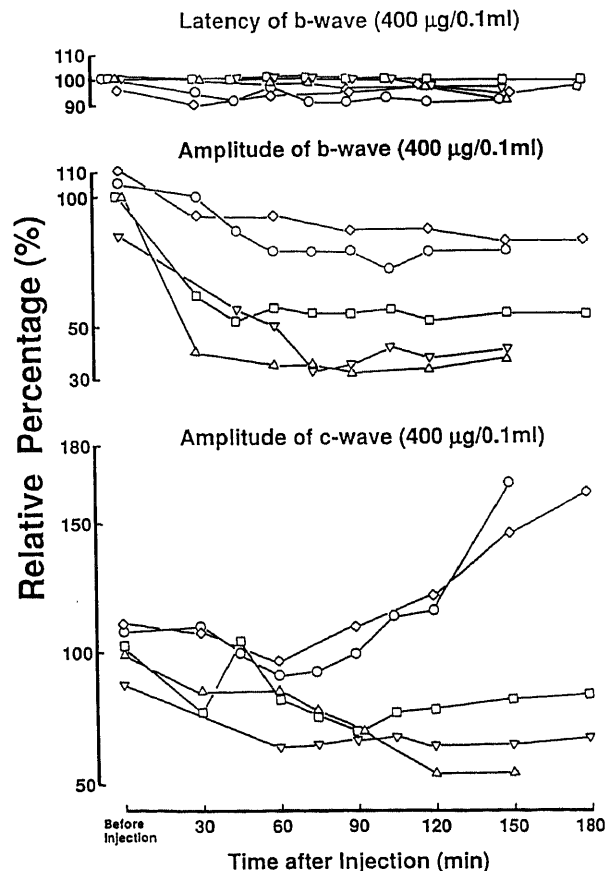


Fig. 18. Changes of the latency and amplitude of the b-wave and the amplitude of the c-wave by an intravitreal injection of 400 µg GM in albino rabbits. The uppermost, middle and lowest graphs show the latency of the b-wave, the amplitude of the b-wave and the amplitude of the c-wave, respectively. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea in the symbols of ○, △, ▽, and  $5 \times 10$  lux at the cornea in the other symbols in this figure.

たが、他の2匹ではGM注入眼刺激と対照眼刺激との間にほとんど差はみられなかった [図20 (図21Cの☆に対応), 図21C].

白色ウサギ1匹において硝子体内注入後4時間に採取した網膜の組織学的所見には特に異常はみられなかった (図19).

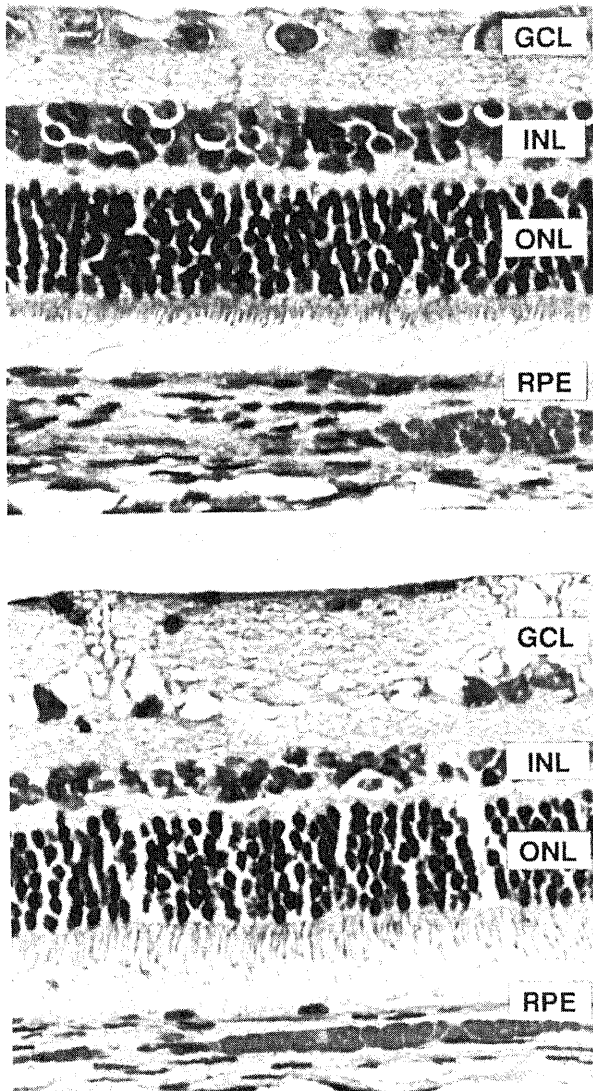


Fig. 19. Light micrograph of the retina of an albino rabbit 4 hr after intravitreal injection of 400 µg GM. Top, control retina. Bottom, the retina of the GM-injected eye. For explanation see the text. Other conditions were the same as in Fig. 8.

II. 慢性実験

研究用原末での実験結果と商用GMでの実験結果はa波, b波およびOPを指標とするかぎりほぼ同様であった. また銀・塩化銀電極とコンタクトレンズ電極を使用した記録との間で, c波を除いてはほぼ同様の結果であったので, 図22~27には交流増幅によるERG所見のみを表示した.

1. GM 80µg (約 47µg/ml) (白色ウサギ5匹および有色ウサギ4匹)

白色ウサギ5匹および有色ウサギ4匹においてほぼ同様の結果を得た. そのうち白色ウサギ1匹および有色ウサギ2匹では直流増幅でERGを記録した. コンタクトレンズ電極で記録した交流増幅ERGの典型例を図22 (図24A, 25A, 26Aと27Aの●に対応) に示す. a波, b波およびOPの振幅ならびに頂点潜時には, 注入後3週目においても対照眼とGM注入眼との間で有意差はなかった (図24A, 25A, 26A, 27A). 注入後4週目のVEPにおいても対照眼刺激とGM注入眼刺激との間で有意差はみられなかった. 図28には直流増幅にて記録したERG波形を示す. b波およびc波の振幅ならびに頂点潜時には注入後8週までに対照眼とGM注入眼との間でほとんど差はなかった.

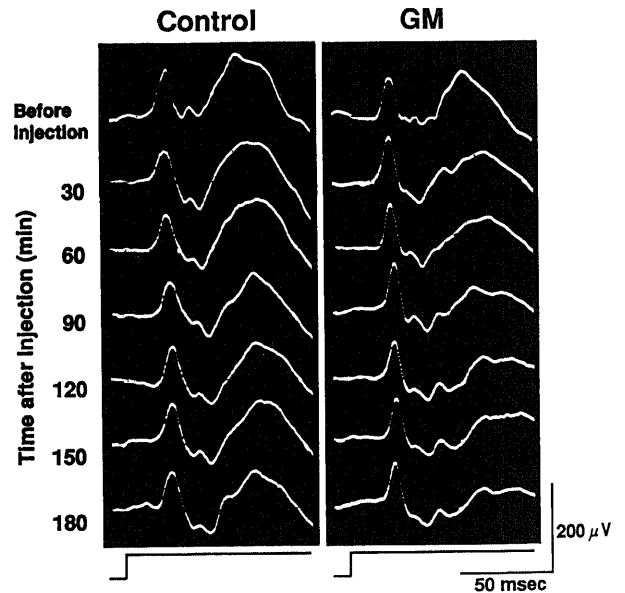


Fig. 20. Effects of an intravitreal injection of 400 µg GM on the VEP of an albino rabbit in vivo. The latency of the initial positive responses of the VEP remained unchanged. The right and left columns show the responses to the stimulation of the GM-injected eye and the control fellow eye respectively. Responses from the same rabbit as in Fig. 15. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. For other recording parameters see the legend for Fig. 7.

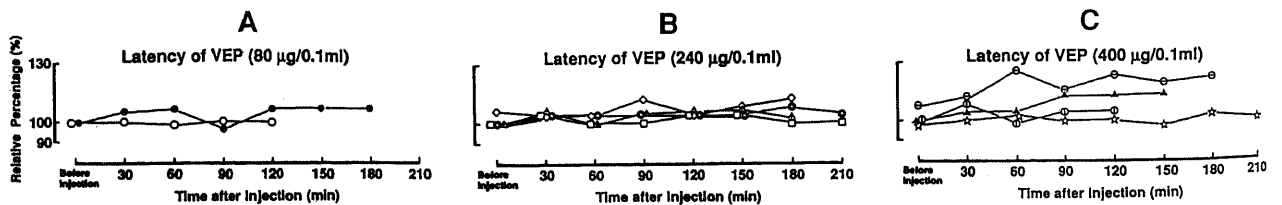


Fig. 21. Changes of the latency of the initial positive responses of the VEP by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea in the symbol of ⊙ in graph C in this figure. Other conditions were the same as in Fig. 9.

有色ウサギにおいて硝子体内注入後2週目に採取した網膜の組織学的所見には特に異常はみられなかった(図29).

GM硝子体内注入前および注入後2週目に行った眼底撮影および蛍光眼底撮影において対照眼に比しGM注入眼において

異常所見は認められなかった(図30, 31).

2. GM 160 $\mu$ g (約 94 $\mu$ g/ml) (白色ウサギ5匹)

5匹中2匹において注入後2週目までにGM注入眼のa波, b波およびOPは消失した(図24B, 25B, 26Bと27Bの◎および☒). しかし対照眼ではa波, b波およびOPはともに注入後2週目までの間ほとんど変化しなかった. 残り3匹中2匹(図24B, 25B, 26Bと27Bの□および◇)のGM注入眼では対

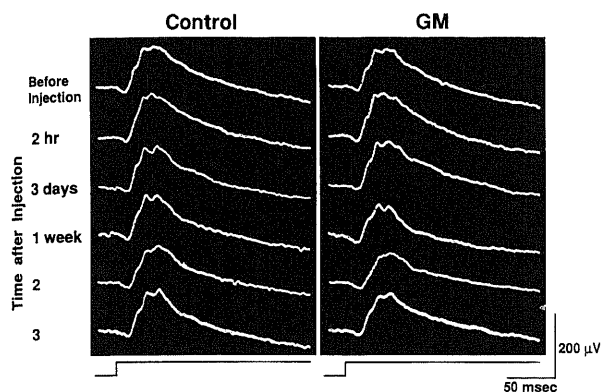


Fig. 22. Effects of an intravitreal injection of 80  $\mu$ g GM on the ERG of a pigmented rabbit. The a- and b-waves were not deteriorated. Each trace shows the averaged waveform of 10 responses. Time constant, 2 sec. Stimulus intensity,  $5 \times 10^2$  lux at the cornea. Stimulus frequency and duration were 1/3 Hz and 500 msec, respectively. Gold ring contact lens electrode was used.

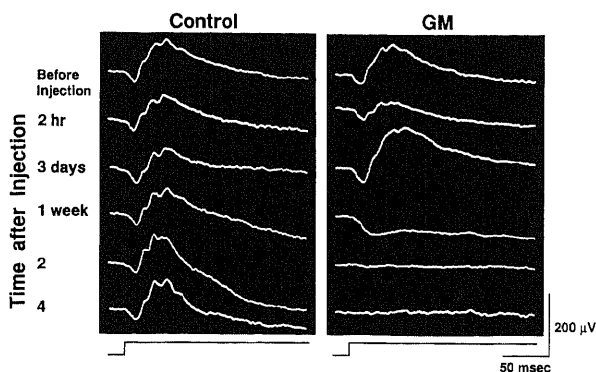


Fig. 23. Effects of an intravitreal injection of 240  $\mu$ g GM on the ERG of an albino rabbit. The ERG was extinguished within 2 weeks after injection. For other recording parameters see the legend for Fig. 22.

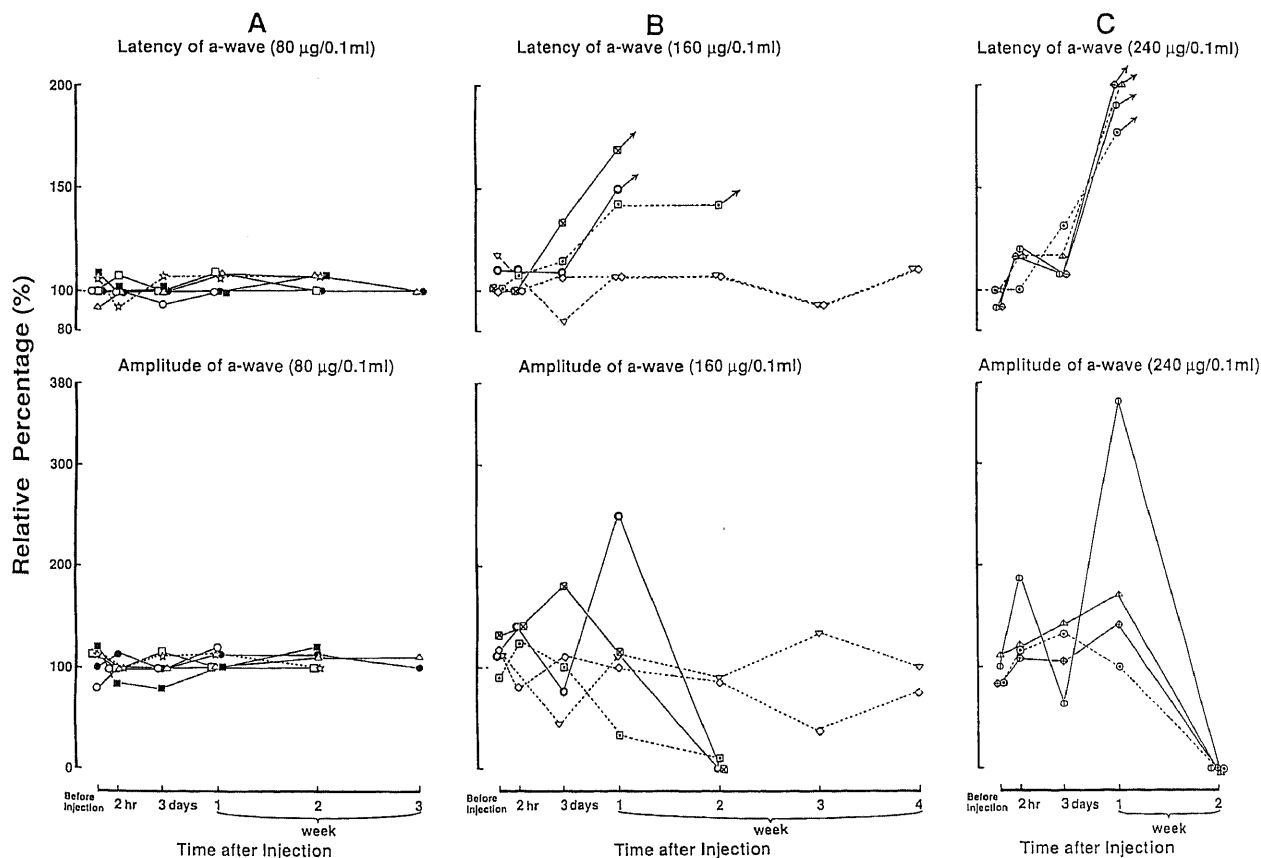


Fig. 24. Changes of the latency and amplitude of the averaged a-wave by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. The dose of intravitreal injection of GM was 80  $\mu$ g, 160  $\mu$ g and 240  $\mu$ g in graphs A, B and C, respectively. Gold ring contact lens electrode was used, and stimulus intensity was  $5 \times 10^2$  lux at the cornea in this figure and Figs. 25, 26, 27. The same symbols indicate the same rabbits in this figure and Figs. 25, 26, 27. Broken and solid lines pertain to the commercially available GM and the reagent powder respectively in this figure and Figs. 25, 26, 27. Arrows in this figure and Figs. 25, 26, 27 indicate that the latency of the ERG could not be measured.

照眼に比し注入後2週目までにb波振幅は減少し(42および69%), b波頂点潜時は軽度に延長し(142および107%), またOP振幅は減少し(O<sub>1</sub>: 0および48%, O<sub>2</sub>: 0および50%) OP頂点潜時は延長した(O<sub>1</sub>: 測定不能および111%, O<sub>2</sub>: 測定不能および116%). 残り1匹(図24B, 25B, 26Bと27Bの▽)では

a波, b波およびOPの振幅ならびに頂点潜時には注入後3週目においても対照眼とGM注入眼の間でほとんど差を認めなかった.

3. GM 200 $\mu$ g (約118 $\mu$ g/ml) (白色ウサギ1匹および有色ウサギ3匹)

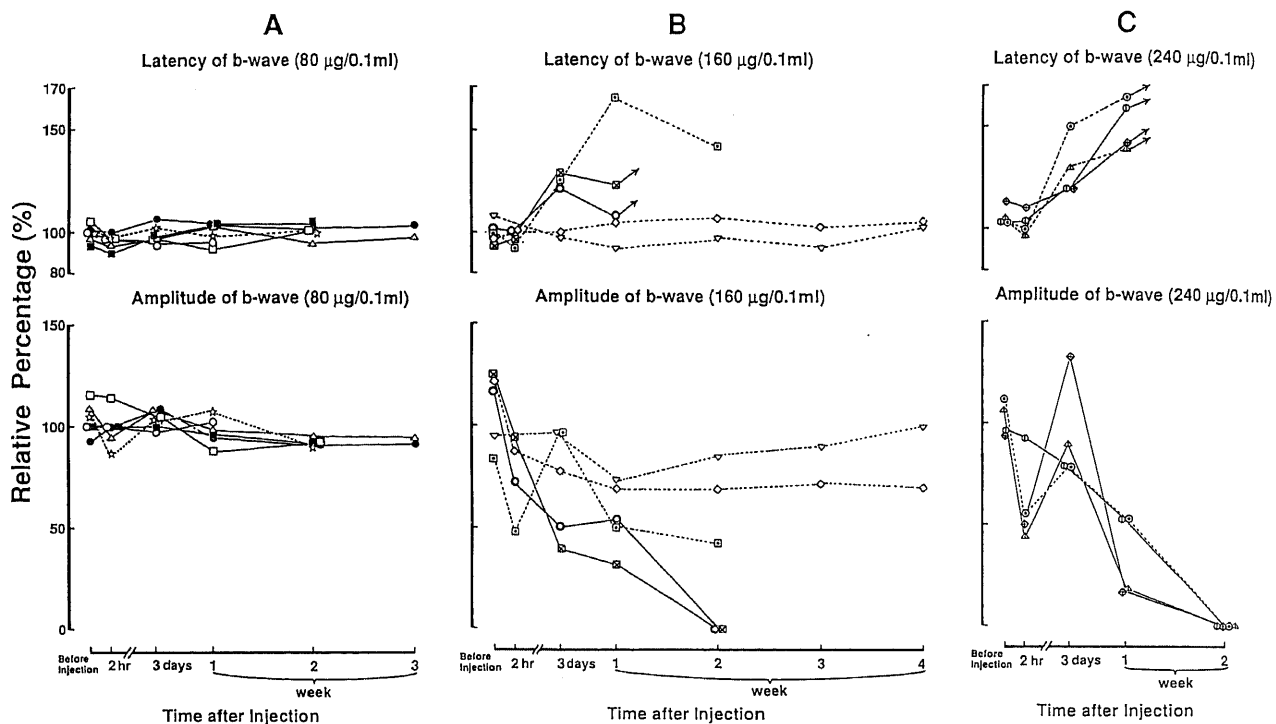


Fig. 25. Changes of the latency and amplitude of the averaged b-wave by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 24.

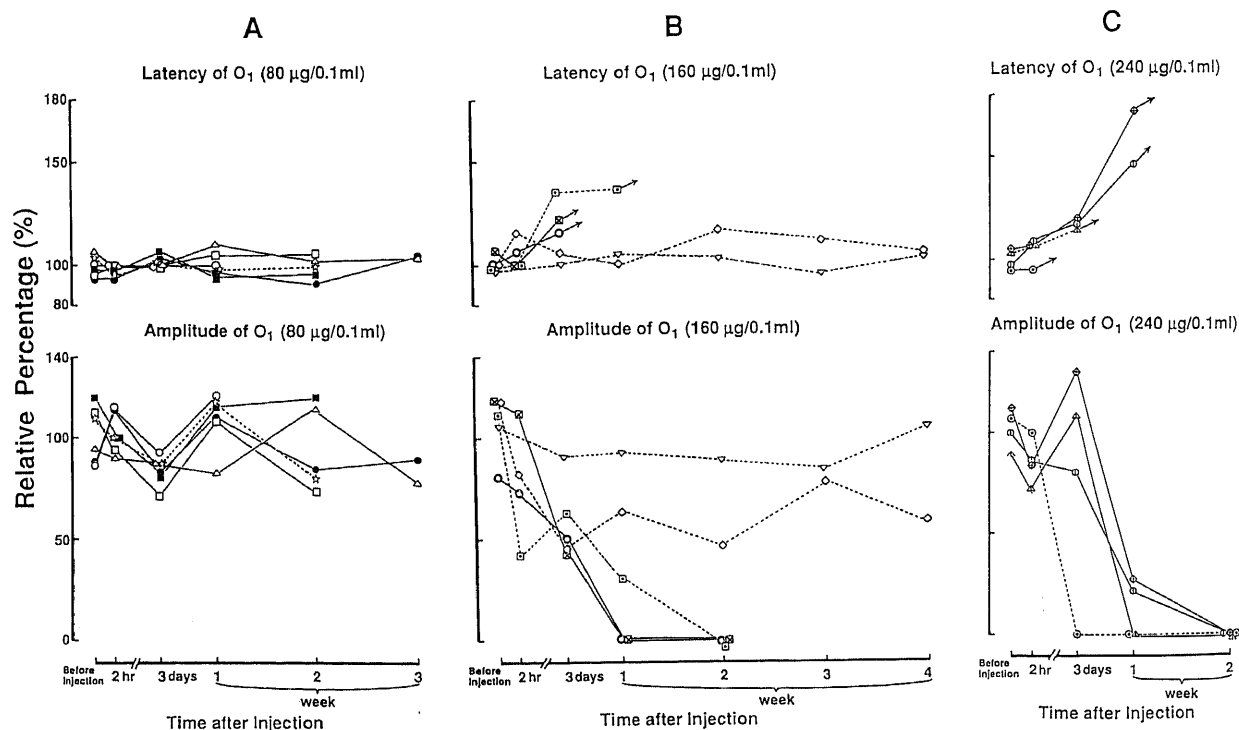


Fig. 26. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential (O<sub>1</sub>) by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 24.

調べた4匹全てで直流増幅にてERGを記録した。

注入後1週では全例でGM注入眼のa波, b波およびOPの振幅の軽度減少または頂点潜時の軽度遅延と角膜側陰性の緩徐な波形がみられた(図32)。有色ウサギ3匹において, 注入後16ないし20週までに角膜側陽性のERG c波が出現してきた(図32)。図32のウサギにおいて注入後16週目に観測したVEPには対照眼刺激とGM注入眼刺激との間で有意差はみられなかった。白色ウサギ1匹において注入後4週までにGM注入眼のa波, b波, c波およびOPは消失し, 注入後28週においても

ERG波形の回復はみられなかった。

調べた3匹全例において眼底撮影では色素沈着が認められ(図33), 蛍光眼底撮影ではほぼその部位に一致した低蛍光が認められた(図34)。

白色ウサギにおいて硝子体内注入後2週目に採取した網膜には視細胞外節の配列の乱れがみられた。

4. GM 240 $\mu$ g (約 141 $\mu$ g/ml) (白色ウサギ4匹)

白色ウサギ4匹においてほぼ同様の結果を得た。交流増幅で記録したERGの典型例を図23(図24C, 25C, 26Cと27Cの

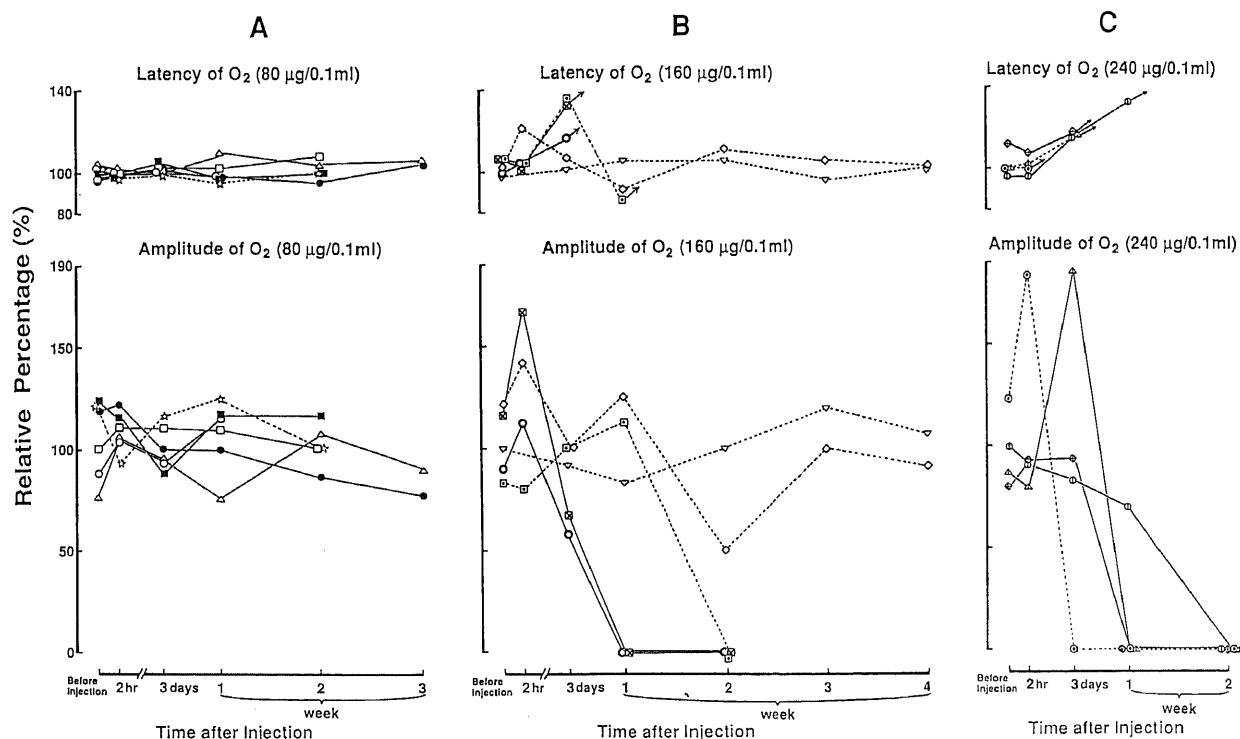


Fig. 27. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential ( $O_2$ ) by an intravitreal injection of GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 24.

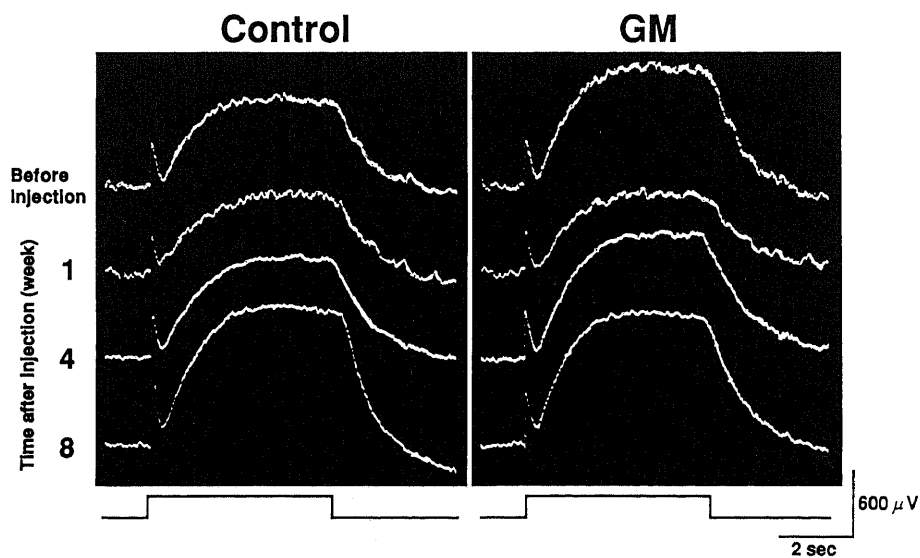


Fig. 28. Effects of an intravitreal injection of 80  $\mu$ g GM on the ERG of an albino rabbit. The b- and c-waves were not deteriorated. A single rectangular stimulus light was used. Direct-coupled amplification. Stimulus intensity, 5 lux at the cornea. Stimulus duration, 5 sec.



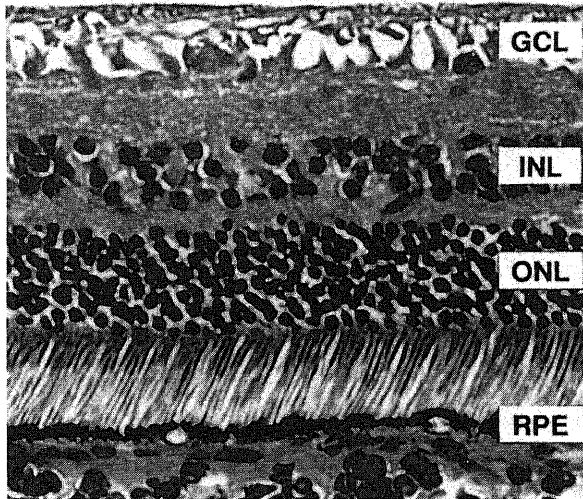


Fig. 29. Light micrograph of the retina of a pigmented rabbit 2 weeks after intravitreal injection of 80  $\mu\text{g}$  GM. For explanation see the text. Other conditions were the same as in Fig. 8.

に対応)に示す。注入後2週目まで GM 注入眼の a 波, b 波および OP は消失した。図24~27には示していないが, 注入後4週目においても ERG 波形の回復はみられなかった。対照眼では a 波, b 波および OP にはともに注入後4週目までの間, 明らかな変化はみられなかった(図24C, 25C, 26C, 27C)。

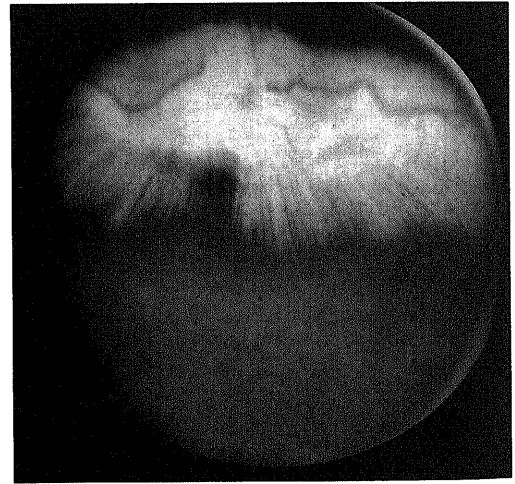
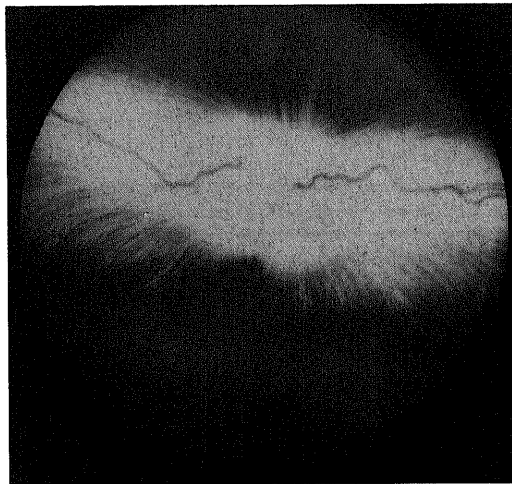
5. GM 400 および 800 $\mu\text{g}$  (約 235 および 471 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (有色ウサギ各1匹)

硝子体内注入後2週目に採取した網膜には RPE の増殖した部分と萎縮あるいは脱落した部分とが混在し, 視細胞外層では内節は比較的保たれているが外節の消失がみられた(図35)。GM 800 $\mu\text{g}$  注入では視細胞外層(内節および外節)の破壊が著明であった。

### Ⅲ. 眼内クリアランス(硝子体内注入法)

ウサギ硝子体中に GM 80 $\mu\text{g}$  を注入した際の前房水および硝子体中 GM 濃度の経時の変化を図36に示す。硝子体中濃度は, 硝子体内注入12時間後で  $39.5 \pm 6.4$  (平均値 $\pm$ 標準偏差, 以下同様)  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 24時間後で  $29.5 \pm 7.4$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48時間後で  $14.7 \pm 3.2$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 72時間後で  $10.5 \pm 1.4$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  と徐々に減少した。前房水中濃度は, 注入後12時間後で  $8.0 \pm 2.1$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 24時間後で  $5.8 \pm 0.7$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48時間後で  $3.0 \pm 0.7$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 72時間後で  $1.8 \pm 0.3$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった(表5)。血清中濃度は各時点ともに測定限

Before  
Injection



2 weeks  
after  
Injection

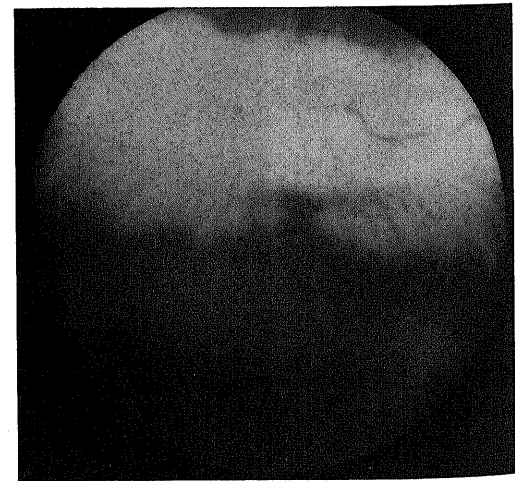


Fig. 30. Fundus photographs after an intravitreal injection of 80  $\mu\text{g}$  GM in a pigmented rabbit. Bottom right, normal-appearing fundus 2 weeks after the injection of GM. Top left, fundus of control fellow eye before the injection of vehicle only.

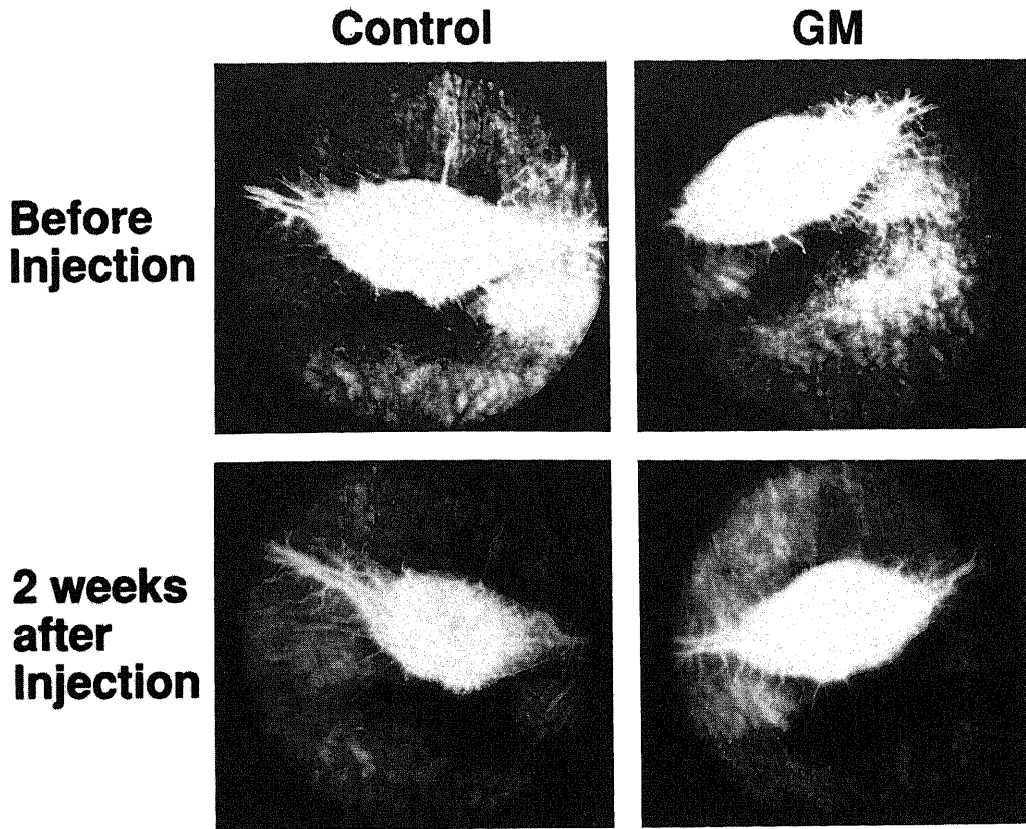


Fig. 31. Fluorescein fundus angiograms after an intravitreal injection of 80  $\mu\text{g}$  GM in a pigmented rabbit. Bottom right, normal-appearing fundus 2 weeks after the injection of GM. Top left, fluorescein angiogram of control fellow eye before the injection of vehicle only. The same rabbit as in Fig. 30.

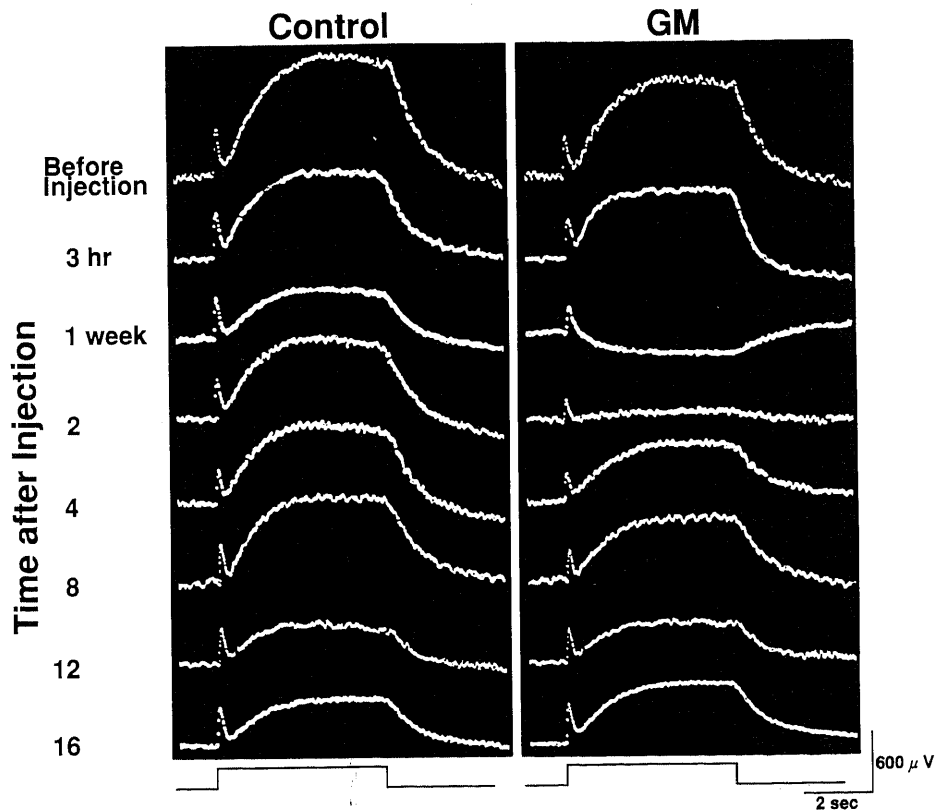


Fig. 32. Effects of an intravitreal injection of 200  $\mu\text{g}$  GM on the ERG of a pigmented rabbit. The c-wave was abolished in all 4 of rabbits tested 1 to 2 weeks after injection. In 3 out of the 4 eyes the c-wave recovered within 4 weeks. In the remaining one eye none of the a-wave, the b-wave, the c-wave and the oscillatory potential was recordable. For other recording parameters see the legend for Fig. 28.

界値 ( $1.0\mu\text{g/ml}$ ) 以下であった。

得られた硝子体中濃度の実測値から回帰直線を求め、その勾配から求めた GM 濃度の硝子体中半減期は約31時間であった。

GM の前房水中濃度と硝子体中濃度の比は、硝子体内注入12時間後で $20.2\pm 3.1\%$ 、24時間後で $20.0\pm 2.9\%$ 、48時間後で $20.4\pm 3.9\%$ 、72時間後で $17.2\pm 1.7\%$ であり、注入後72時間を除いてほぼ一定であった(表6)。

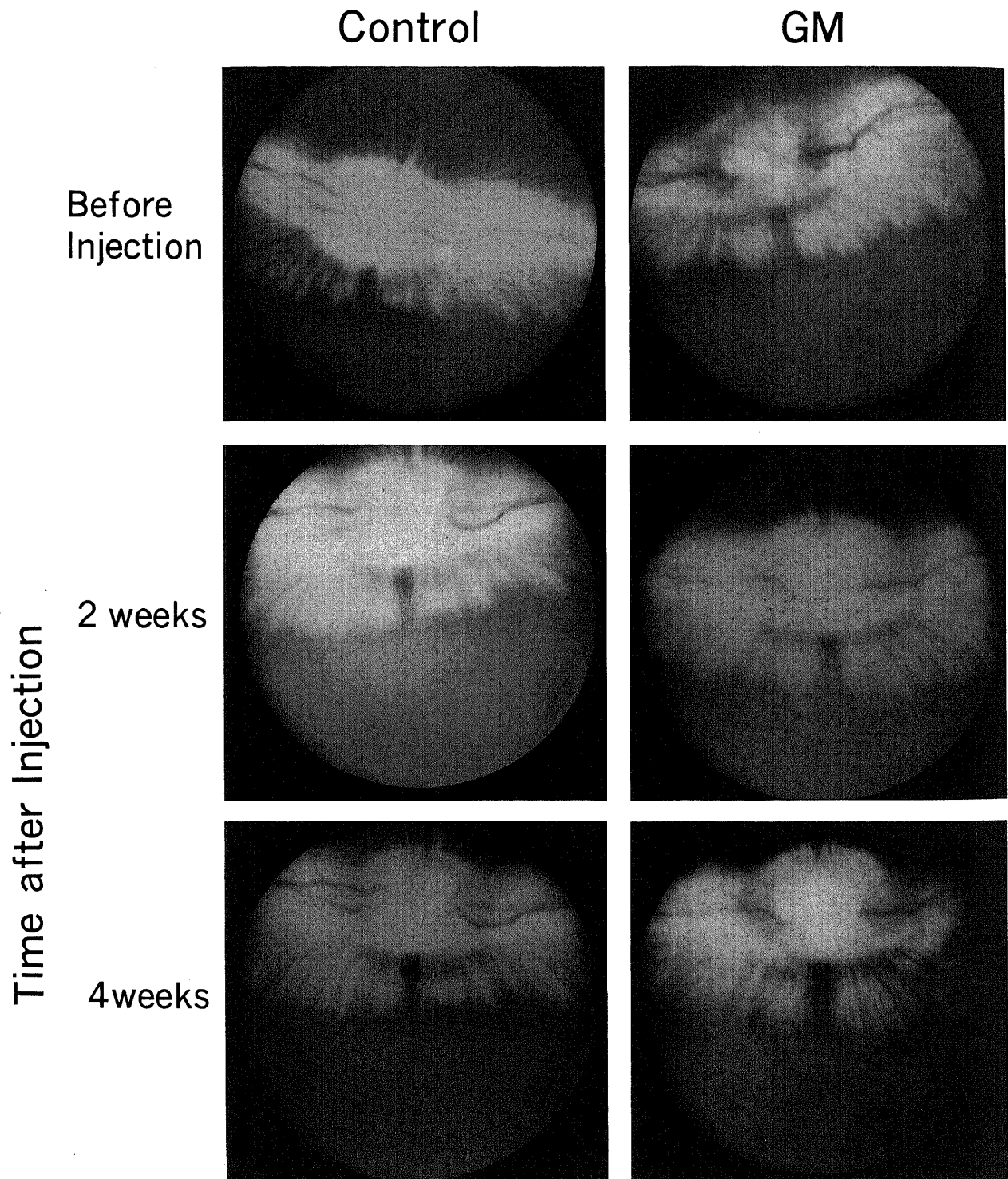


Fig. 33. Fundus photographs after an intravitreal injection of  $200\mu\text{g}$  GM in a pigmented rabbit. Middle right, hyperpigmented lesions were visible throughout the retina 2 weeks after the injection of GM. Top left, fundus photo of control fellow eye before the injection of vehicle only. Middle and bottom left, normal-appearing fundus 2 and 4 weeks respectively after the injection of vehicle only.

Ⅳ. 2回硝子体内注入(白色ウサギ4匹および有色ウサギ4匹)  
 図42, 45には銀・塩化銀電極を用いて記録した ERG 所見の  
 みを示す.

コンタクトレンズ電極を用いて ERG を記録した白色ウサギ  
 2匹のうち1匹(図43と44の△)で再注入後4日目で GM 注入

眼の OP 振幅の減少( $O_1$ : 78%,  $O_2$ : 48%)および頂点潜時の軽  
 度延長( $O_1$ : 110%,  $O_2$ : 115%)がみられ, OP 振幅の減少は一  
 旦回復傾向を示したが, 再注入後25日目では  $O_2$  振幅比は75%  
 であった(図37). 残り1匹(図43と44の◇)では  $O_2$  振幅の増大  
 (147%)がみられ,  $O_2$  振幅の増大は再注入後11日目には回復傾

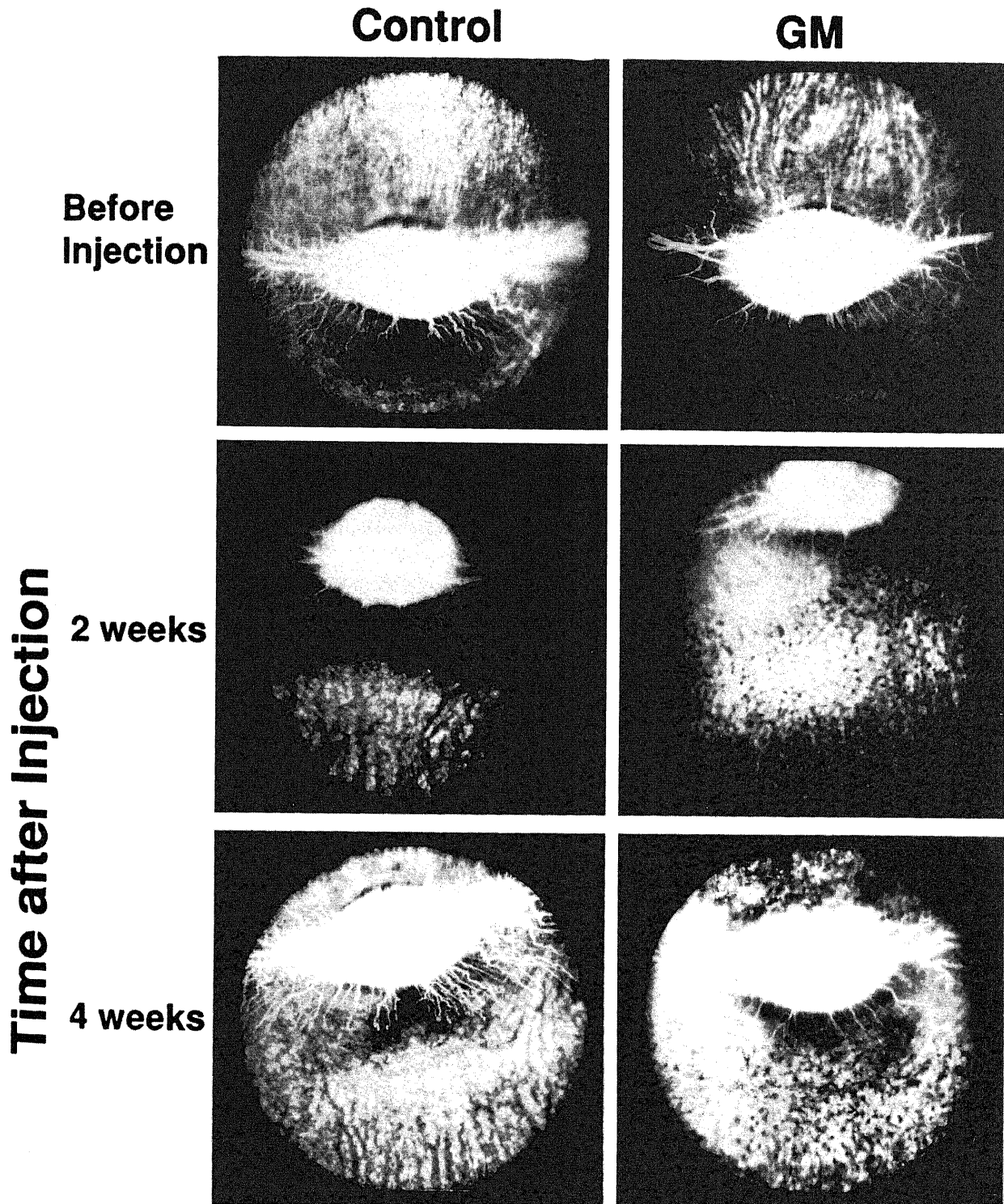


Fig. 34. Fluorescein fundus angiograms after an intravitreal injection of 200  $\mu$ g GM in a pigmented rabbit. Middle right, hyperpigmented lesions blocked the background fluorescence 2 weeks after the injection of GM. Middle and bottom left, normal-appearing fluorescein angiograms 2 and 4 weeks respectively after the injection of vehicle only. The same rabbit as in Fig. 33.

向を示した。GM 注入の a 波および b 波には対照眼に比しほとんど変化はみられなかった。

直流増幅 ERG では再注入後 4 日目で b 波振幅の減少 (5 lux 単発波形: 60~76%) が 6 匹中 4 匹 (図45中の○・□・◆・▲) でみられ, うち 1 匹 (図45中の◆に対応) を除いて再注入後 11ないし25日目には回復傾向を示した。その 4 匹中 2 匹 (図42A下の◆および○) で a 波振幅の減少 (60および75%) が再注

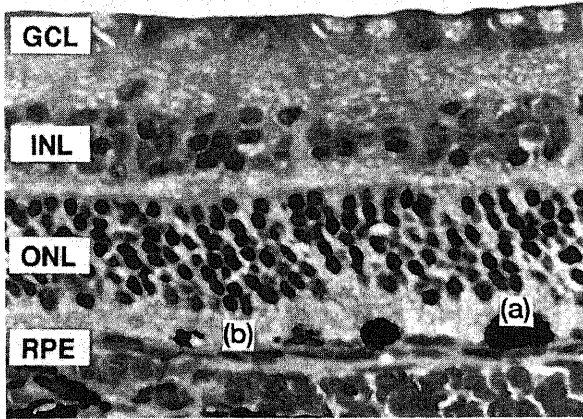


Fig. 35. Light micrograph of the retina of a pigmented rabbit 2 weeks after intravitreal injection of 400 μg GM. Note mild pigment epithelial changes (a) and prominent loss of outer segments (b). Other conditions were the same as in Fig. 8.

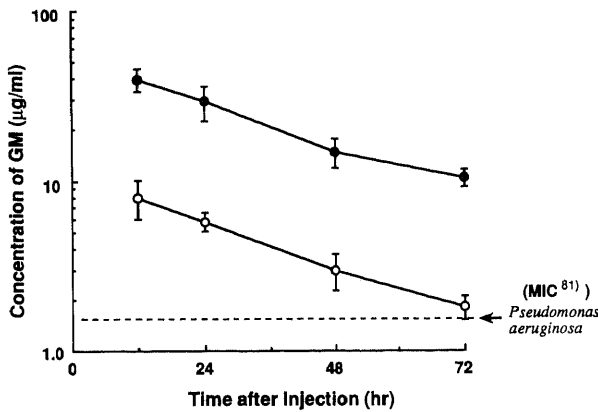


Fig. 36. Concentration of GM in the vitreous and aqueous humor of albino rabbits 12, 24, 48 and 72 hr after intravitreal injection of 80 μg GM. Each data point shows the mean and standard deviation in at least six eyes. ●, vitreous humor. ○, aqueous humor.

Table 5. Concentration of GM in the vitreous humor and aqueous humor after an intravitreal injection of 80 μg

Time after Injection (hr)	Vitreous	Aqueous
12	39.5±6.4 (6)	8.0±2.1 (6)
24	29.5±7.4 (8)	5.8±0.7 (8)
48	14.7±3.2 (6)	3.0±0.7 (6)
72	10.5±1.4 (6)	1.8±0.3 (6)

Values are the mean ± SD (μg/ml). Number of eyes is indicated in parenthesis.

入後 4 日目でみられ, そのうち 1 匹 (図42A下の○) では a 波振幅は回復傾向を示したが, 他の 1 匹 (図42A下の◆) では再注入後 53 日目でも減少がみられた。残り 2 匹 (図42, 43と45上中の●および■) では再注入後 25 日目まで a 波および b 波には対照眼に比しほとんど変化はみられなかった。c 波では 6 匹中 2 匹 (図45下の■および●) で増大 (133および257%), 1 匹 (図45下の○) で減少 (19%) が再注入後 4 日目にみられたが, 再注入後

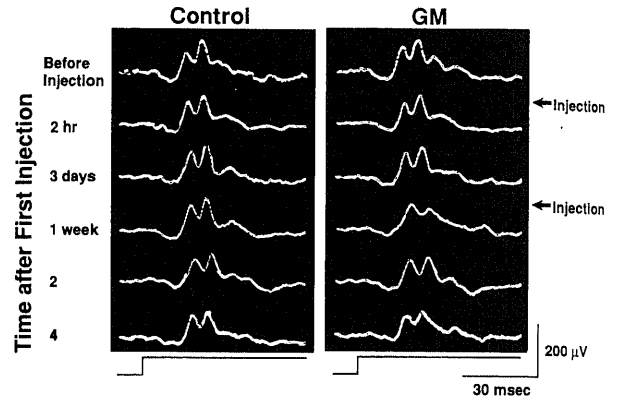


Fig. 37. Effects of two intravitreal injections of 80 μg GM at the 3-day-interval on the ERG of an albino rabbit. The oscillatory potential transiently decreased after second injection. Each trace shows the averaged waveform of 10 responses. Time constant, 3 msec. Stimulus intensity, 5×10<sup>2</sup> lux at the cornea. Stimulus frequency and duration were 1/3 Hz and 500 msec, respectively. Gold ring contact lens electrode was used.

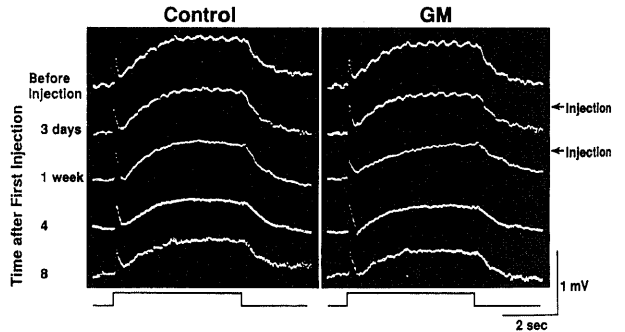


Fig. 38. Effects of two intravitreal injections of 80 μg GM at the 3-day-interval on the ERG of a pigmented rabbit. The b-wave amplitude decreased 4 days after second injection and recovered within 25 days after second injection. A single rectangular stimulus light was used. Direct-coupled amplification. Stimulus intensity, 5 lux at the cornea. Stimulus duration, 5 sec.

Table 6. GM concentration in aqueous humor (Ca) expressed in percentage to intravitreal concentration (Cv) at 4 different times after intravitreal injection

Time after Injection (hr)	Ca/Cv (%)
12	20.2±3.1 (6)
24	20.0±2.9 (8)
48	20.4±3.9 (6)
72	17.2±1.7 (6)

Values are the mean ± SD. Number of eyes is indicated in parenthesis.

53日目には回復傾向を示した。OP 振幅は 6 匹中 3 匹 (図44の ■・◆・□) で減少 ( $O_2$ : 53~67%) したが、再注入後53日目までには回復した。また OP 振幅減少がみられなかった白色ウサギ (図44の○) において再注入後4日目に頂点潜時の軽度延長 ( $O_1$ : 118%,  $O_2$ : 119%) がみられたが、再注入後53日目までには回復した。図38のウサギにおいて再注入後53日目に観測した VEP には、対照眼刺激と GM 注入眼刺激との間で有意差はみられなかった (図39)。

眼底検査を行った有色ウサギ 3 匹中 1 匹 (図42~45の◆) で再注入後4日目に後極部を中心に多数の小白斑がみられた (図40中)。同時期の蛍光眼底検査では白斑に一致して過蛍光がみられた (図40下)。

有色ウサギにおいて再注入後25日目に採取した網膜の組織学的所見には特に異常はみられなかった (図41)。

#### V. 硝子体切除術

##### 1. 硝子体内注入 (白色ウサギ3匹および有色ウサギ2匹)

調べた 5 匹全例において GM 80 $\mu$ g 硝子体内注入では注入後4週まで a 波, b 波, c 波および OP にはほとんど変化はみられなかった [図46 (図49~52の●に対応), 図49~52]。硝子体内注入後4週目に観測した VEP には対照眼刺激と GM 注入眼刺激との間で有意差はみられなかった [図47 (図49~52の□に対応)]。

注入後4週目の GM 注入眼の網膜組織学的所見には明らかな異常はみられなかった [図48 (図49~52の□に対応)]。

##### 2. 眼内灌流液中への GM 添加

###### 1) GM 20 $\mu$ g/ml 硝子体内灌流 (有色ウサギ 4 匹)

硝子体切除術後4週まで a 波, b 波, c 波および OP には対照眼と比べほとんど変化はみられなかった [図53 (図57A, 58A, 59A, 60A, 61A, 62Aと63Aの▲に対応), 図57A, 58A, 59A, 60A, 61A, 62A, 63A]。図には示していないが、

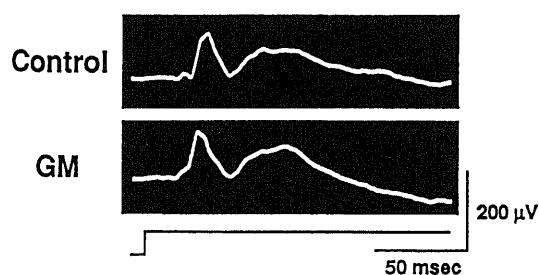
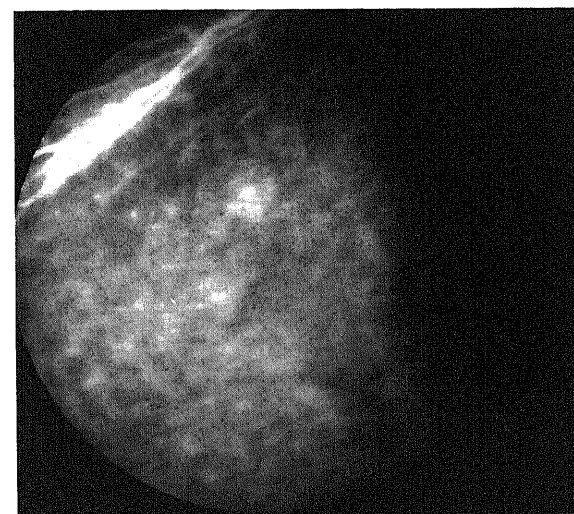
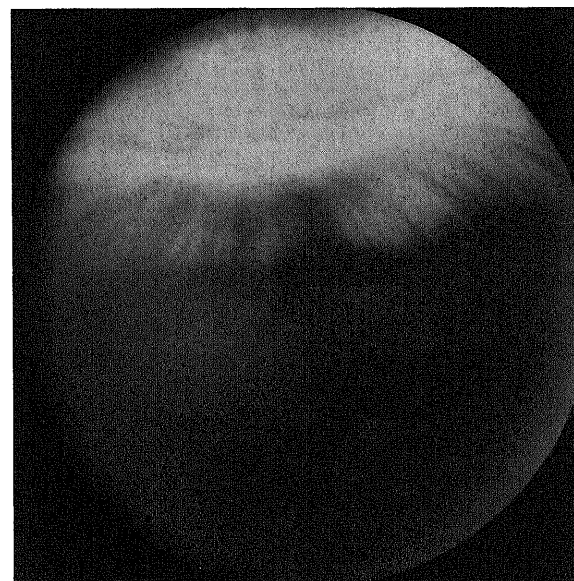
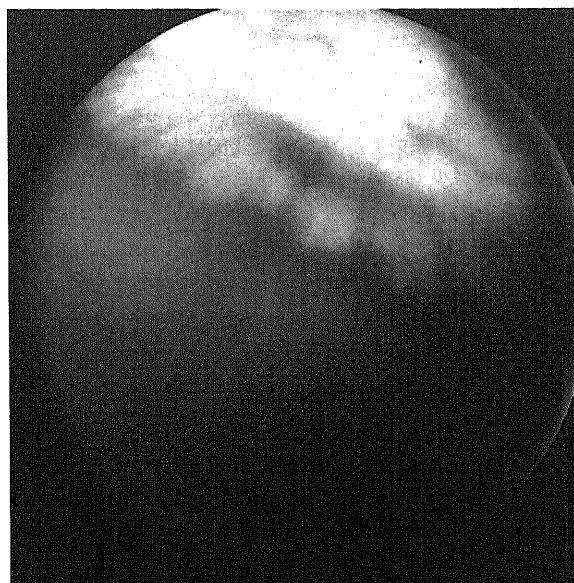


Fig. 39. Effects of two intravitreal injections of 80  $\mu$ g GM at the 3-day-interval on the VEP of a pigmented rabbit. The initial positive responses of the VEP were unchanged 8 weeks after first intravitreal injection. The upper and lower traces show the responses to the stimulation of the control eye and the GM-injected eye respectively. Responses from the same rabbit as in Fig. 38. For other recording parameters see the legend for Fig. 7.

Fig. 40. Fundus photographs and fluorescein fundus angiogram after two intravitreal injections of 80  $\mu$ g GM at the 3-day-interval in a pigmented rabbit. Top, normal-appearing fundus 4 days after second injection of vehicle only. Middle, small white dots were visible throughout the retina 4 days after second injection of GM. Bottom, hyperfluorescences were visible in fluorescein fundus angiogram of the retina 4 days after second injection of GM. Photographs from the same rabbit as in Fig. 38.



硝子体手術後 4 週目の VEP の早期成分および網膜組織学的所見においても異常はみられなかった。

2) GM 50 $\mu$ g/ml 硝子体内灌流 (白色ウサギ 5 匹および有色ウサギ 2 匹)

a 波振幅は 7 匹中 1 匹 (図57B下と59B下の●) で硝子体切除後 1 週で減少 (68%) したが, 手術後 4 週目までには回復した。また他の 1 匹 (図57B下と59B下の◇) において a 波振幅は手術後 1 週で増大したが, 術後 4 週には回復した。a 波頂点潜時は 1 匹 (図57B上と59B上の◇) において術後 1 週目に延長したが術後 4 週目までには回復した。b 波振幅は 7 匹中 3 匹で硝子体切除後 1~2 週で軽度減少したが (5 lux 単発波形: 53~78%; 図63B中の△・◇・○, 単発波形: 66~71%; 図58

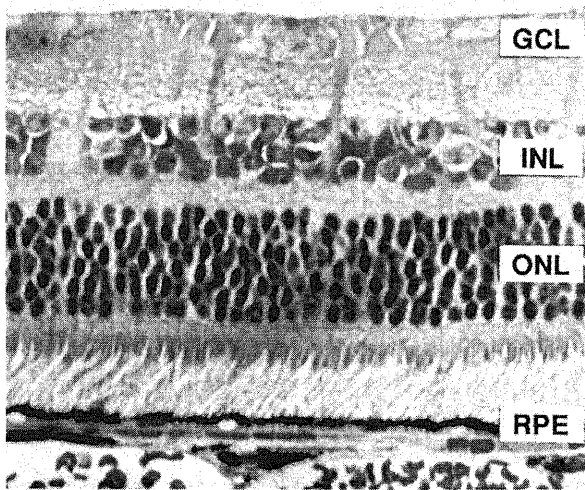


Fig. 41. Light micrograph of the retina of a pigmented rabbit 4 weeks after the second intravitreal injection of 80  $\mu$ g GM. For explanation see the text. Other conditions were the same as in Fig. 8.

B下の◇・□・△, 加算波形: 50~74%; 図60B下の◇・□・▽), 手術後 4 週目までにはほぼ回復傾向を示した [図54 (図63B中の□に対応), 図58B下, 60B下, 63B中]. b 波の頂点潜時は 1 匹 (図58B上の◇) において手術後 1 週目に短縮したが, 術後 4 週目までには回復した。c 波の振幅は術後 2~4 週目で 7 匹中 2 匹 (図63下の△および◇) で増大し, また他の 2 匹 (図63下の▲および□) においては手術後 1~2 週目に減少し, その後回復傾向を示した [図54 (図63B下の□に対応), 図63B下].  $O_1$  あるいは  $O_2$  振幅の減少が硝子体切除後 1~4 週目で 7 匹中 5 匹 (図61B下と62B下の●・△・▲・▽・◇) でみられた。また 7 匹中 2 匹 (図61B上と62B上の△・◇) において手術後 1~3 週目に  $O_1$  頂点潜時の延長がみられたが, 4 週目には回復傾向を示した。

硝子体切除術後 4 週目に観測した VEP には対照眼刺激と GM 注入眼刺激との間で有意差はみられなかった [図55 (図57B, 58B, 59B, 60B, 61B, 62Bと63Bの□に対応)].

硝子体切除後 4 週目に検討した GM 灌流眼の網膜組織学的所見には対照眼に比し明らかな異常はみられなかった [図56 (図57B, 58B, 59B, 60B, 61B, 62Bと63Bの□に対応)].

3. 無処置眼, 硝子体切除眼または硝子体および水晶体切除眼への GM 移行

GM 5mg/kg 大腿筋肉内注射後 1 時間の血清中濃度は 7.6  $\pm$  2.3 $\mu$ g/ml であった (表 7)。

無処置眼および硝子体切除眼における硝子体中 GM 濃度は全て測定限界値 (0.3 $\mu$ g/ml) 以下であった。硝子体および水晶体切除眼においては手術直後 1 眼, 手術翌日 4 眼および 1 週間後 2 眼以外では硝子体中に GM は検出された (表 7)。

考 察

抗生剤が網膜におよぼす影響を評価する際, 薬剤自体の特性以外の要因 (pH および浸透圧) が ERG におよぼす影響を検討する必要がある。商用 GM (ゲンタシン<sup>®</sup> 注, シェリング・プ

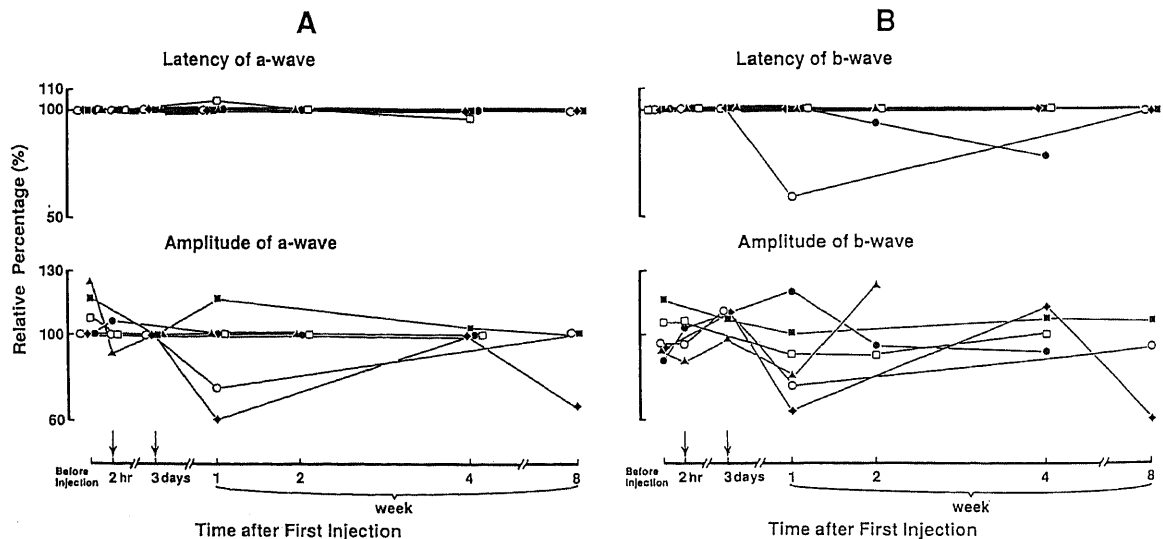


Fig. 42. Changes of the latency and amplitude of the a-wave (A) and the b-wave (B) by two intravitreal injections of 80  $\mu$ g GM at the 3-day-interval in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea in this figure and Figs. 43, 44. The ERG on 3rd day after the first injection was recorded 2 hr after second injection in the rabbit indicated by the symbol ▲, and just before second injection in all other rabbits. The same symbols indicate the same rabbits in this figure and Figs. 43, 44, 45. Arrows indicate the intravitreal injection of GM in this figure and Figs. 43, 44, 45.

ラウ) アンブル中の pH は 3.5~5.5 であるという<sup>60)</sup>。そこで本実験に先立ちオペガード<sup>®</sup> MA あるいは BSSplus<sup>®</sup> に GM 原末を溶解した際の pH および浸透圧を調べた。オペガード<sup>®</sup> MA およびオペガード<sup>®</sup> MA に溶解した GM 注射液ならびに BSSplus<sup>®</sup> および BSSplus<sup>®</sup> に溶解した GM 灌流液の pH および浸透圧の測定には pH-浸透圧計 HOSM-1 (TOA, 東京) を用いた。オペガード<sup>®</sup> MA の pH は 7.3, 浸透圧は 298 mOsmol であった。本研究で電気生理学的検討に用いた硝子体内注射液の GM 濃度は最小注入量 80 $\mu$ g では 800 $\mu$ g/ml, 最大注入量 GM 400 $\mu$ g では 40mg/ml であった。またウサギ硝子体内 (1.7ml) に均等に拡散すると仮定して計算された GM 硝子体内濃度はそれぞれ 47 $\mu$ g/ml, 235 $\mu$ g/ml であった。オペガード<sup>®</sup> MA を溶媒とした GM 液 (40mg/ml, 800 $\mu$ g/ml, 235 $\mu$ g/ml ならびに 47 $\mu$ g/ml) の pH および浸透圧はそれぞれ 5.7~7.3 および 292~300mOsmol の範囲内であった。また硝子体切除術の際に用いた BSS plus<sup>®</sup> の pH は 7.4, 浸透圧は 306mOsmol であり, GM 50 $\mu$ g/ml 灌流液の pH および浸透圧

はそれぞれ 7.7 および 318mOsmol であった。Davson ら<sup>61)</sup> によるとウサギ硝子体の pH は 7.21 であるという。一方, 川口ら<sup>62)</sup> によるとウサギ摘出眼杯における ERG は浸漬液 pH 8.0~8.2 において安定に維持されるが, 塩酸添加などにより pH を 7.4 付近まで低下させると b 波振幅は減少するという。従って摘出眼杯と生体という実験系の違いはあるが, 本研究において GM 硝子体内注入による pH 低下に起因する ERG 変化の可能性を一応考慮せねばならない。しかし本研究における硝子体内注入量はウサギ硝子体容積に対して約 5~6% に過ぎず, しかも硝子体内注入を緩徐に行えば生体眼は大きなイオン緩衝能力を有する<sup>63)</sup> ので, 少なくとも長期的 ERG 変化に対する pH の影響は少ないと考えられる。柴田<sup>64)</sup> によると 20mOsmol 以上の浸透圧の上昇は ERG の b 波振幅の減少を惹起させるという。本田<sup>65)</sup> は白色ウサギを用い生体眼杯灌流法にて b 波を指標として種々の人工灌流液の網膜におよぼす影響を検討し, オペガード<sup>®</sup> MA では灌流後 60 分でも b 波振幅は標準液 (modified Ames solution) 灌流時の 90% を維持したという。従って本研究

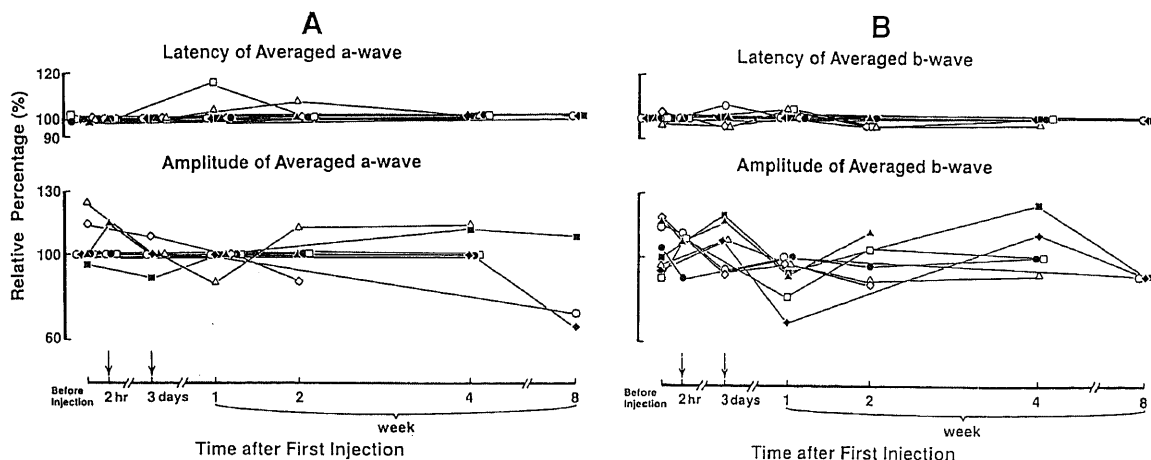


Fig. 43. Changes of the latency and amplitude of the averaged a-wave (A) and the averaged b-wave (B) by two intravitreal injections of 80  $\mu$ g GM at the 3-day-interval in albino and pigmented rabbits. Gold ring contact lens electrode was used, and stimulus intensity was  $5 \times 10^2$  lux at the cornea in the symbol of  $\Delta$ ,  $\diamond$  in this figure and Fig. 44. Other conditions were the same as in Fig. 42.

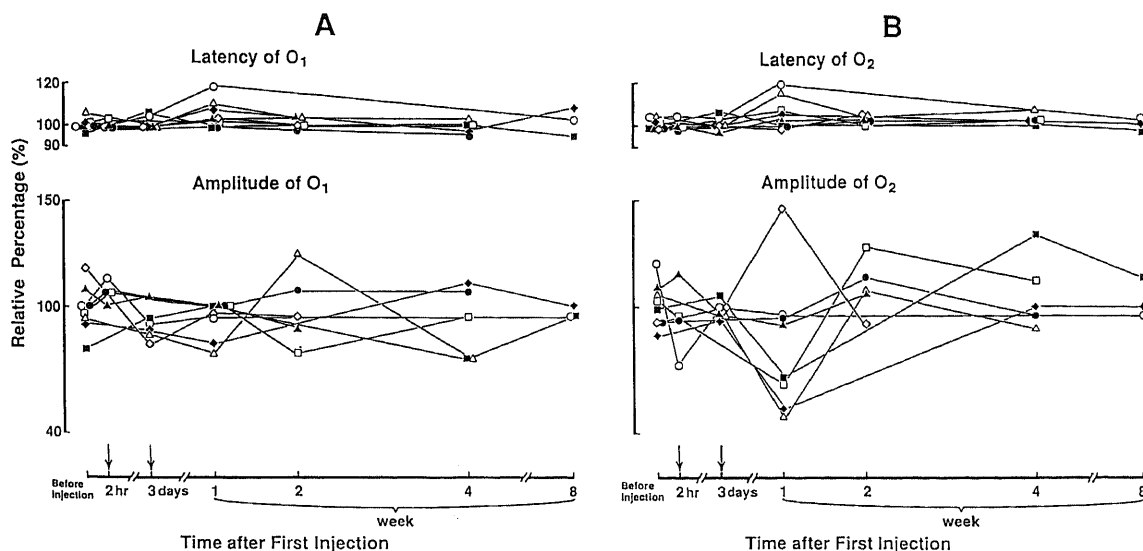


Fig. 44. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential (A,  $O_1$ ; B,  $O_2$ ) by two intravitreal injections of 80  $\mu$ g GM at the 3-day-interval in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Figs. 42, 43.



においてはオベガード<sup>®</sup> MA および BSSplus<sup>®</sup> を用いた実験による浸透圧変化が高々 12mOsmol 前後であること、前述した如く硝子体内注入を緩徐に行っていること、生体眼は代償機構を有する<sup>63)</sup> ことなどから推して本研究の急性期にみられる ERG

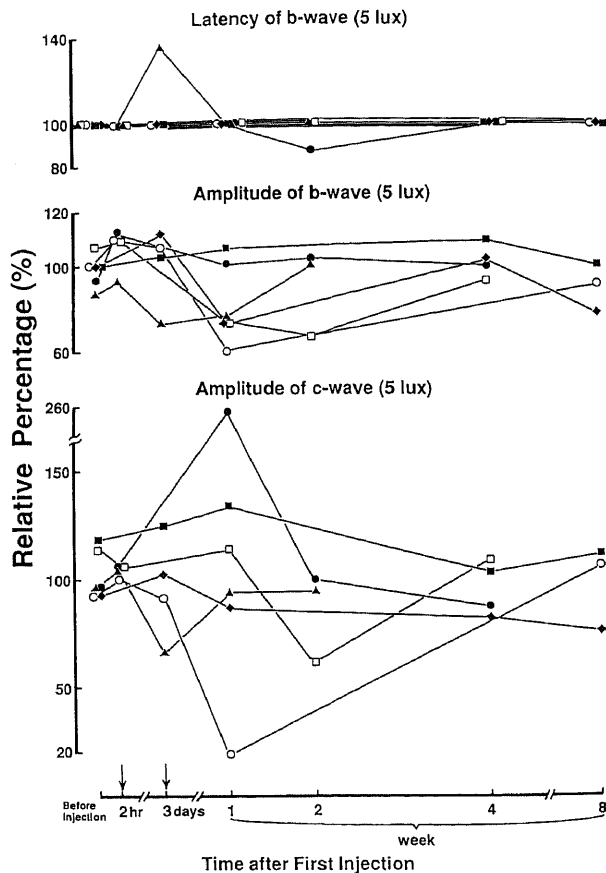


Fig. 45. Changes of the latency and amplitude of the b-wave (top, middle) and the amplitude of the c-wave (bottom) by two intravitreal injections of 80 µg GM at the 3-day-interval in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea. Other conditions were the same as in Fig. 42.

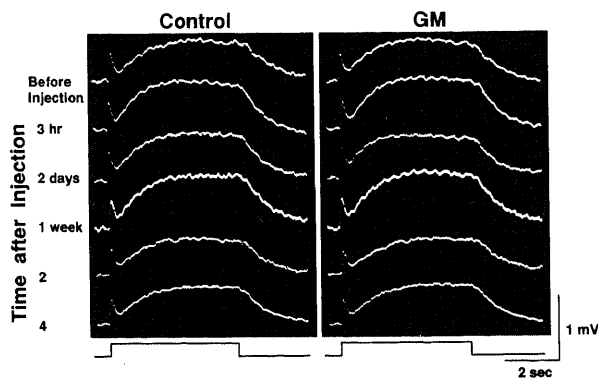


Fig. 46. Effects of an intravitreal injection of 80 µg GM 4 weeks after vitrectomy on the ERG of a pigmented rabbit. The b- and c- waves remained unchanged. An intravitreal injection was performed more than 4 weeks after vitrectomy in this figure and Figs. 47, 48, 49, 50, 51, 52. A single rectangular stimulus light was used. Direct-coupled amplification. Stimulus intensity, 5 lux at the cornea. Stimulus duration, 5 sec.

変化の主因が浸透圧変化とは考えがたい。加えてウサギ摘出眼杯を用いた ERG において GM 23~184µg/ml (ウサギ硝子体内に注入したと仮定した場合の注入量では約 39~313µg) 灌流中の pH および浸透圧変化は対照灌流液 (長山第Ⅱ液) の実測値 (pH: 8.0~8.2, 浸透圧300±3mOsmol) 内にとどまった<sup>20)</sup> ことから、硝子体切除術の際に使用した灌流液に GM を添加することによって生じる pH および浸透圧変化は僅かなものと推定され、慢性的観察における ERG 変化にほとんど影響をおよぼさないと推測される。

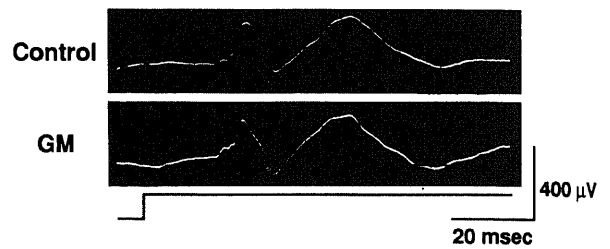


Fig. 47. Effects of an intravitreal injection of 80 µg GM 4 weeks after vitrectomy on the VEP of an albino rabbit. The initial positive responses of the VEP were unchanged 4 weeks after injection. The upper and lower traces show the responses to the stimulation of the control eye and the GM-injected eye respectively. For other recording parameters see the legend for Fig. 7.

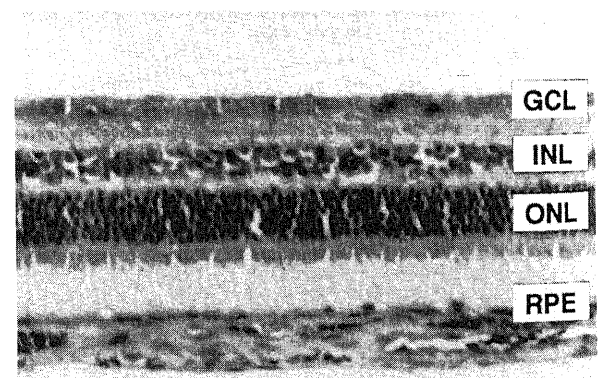
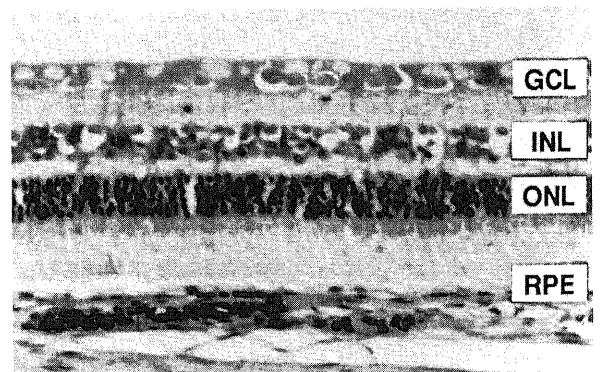


Fig. 48. Light micrograph of the retina of a vitrectomized eye of an albino rabbit 4 weeks after an intravitreal injections of 80 µg GM. Top, control retina. Bottom, the retina of the GM-injected eye. Light micrograph from the same rabbit as in Fig. 47. Magnification, ×100. For explanation see the text. Other conditions were the same as in Fig. 8.

ERG を記録する際には被験動物を無動化し実験を容易にし  
かつ動物愛護の観点から全身麻酔薬の使用は不可欠である。  
従って麻酔薬の ERG におよぼす影響を考慮しなければならない。  
特に慢性的観察では記録の度に麻酔剤を投与する必要があ

る。本研究では塩酸ケタミンあるいはウレタンを使用した。塩  
酸ケタミンの使用に際しては Sasovetz<sup>23</sup> が報告した ERG に変  
化をおよぼさない投与量(25mg/kg)を用いた。塩酸ケタミン麻  
酔下にて c 波のような緩徐な振れを観察するには上記投与量を

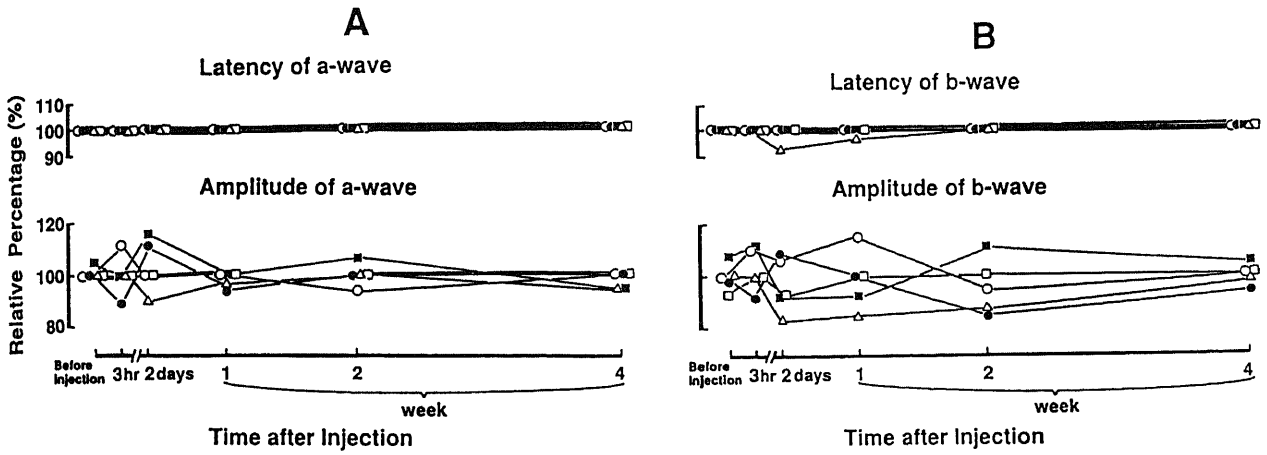


Fig. 49. Changes of the latency and amplitude of the a-wave (A) and the b-wave (B) by an intravitreal injection of 80 µg GM 4 weeks after vitrectomy in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea in this figure and Figs. 50, 51. The same symbols indicate the same rabbits in this figure and Figs. 50, 51, 52.

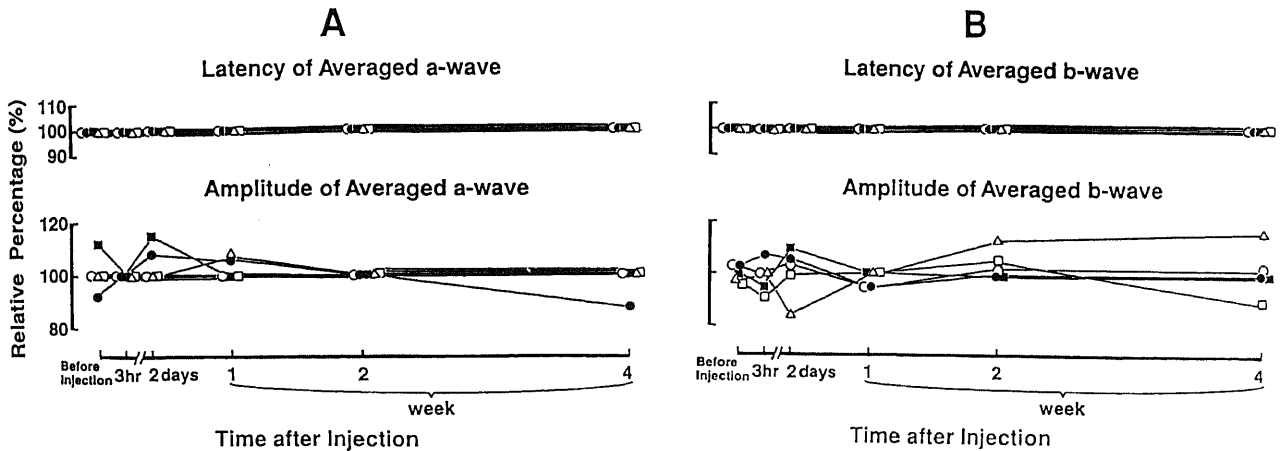


Fig. 50. Changes of the latency and amplitude of the averaged a-wave (A) and the averaged b-wave (B) by an intravitreal injection of 80 µg GM 4 weeks after vitrectomy in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 49.

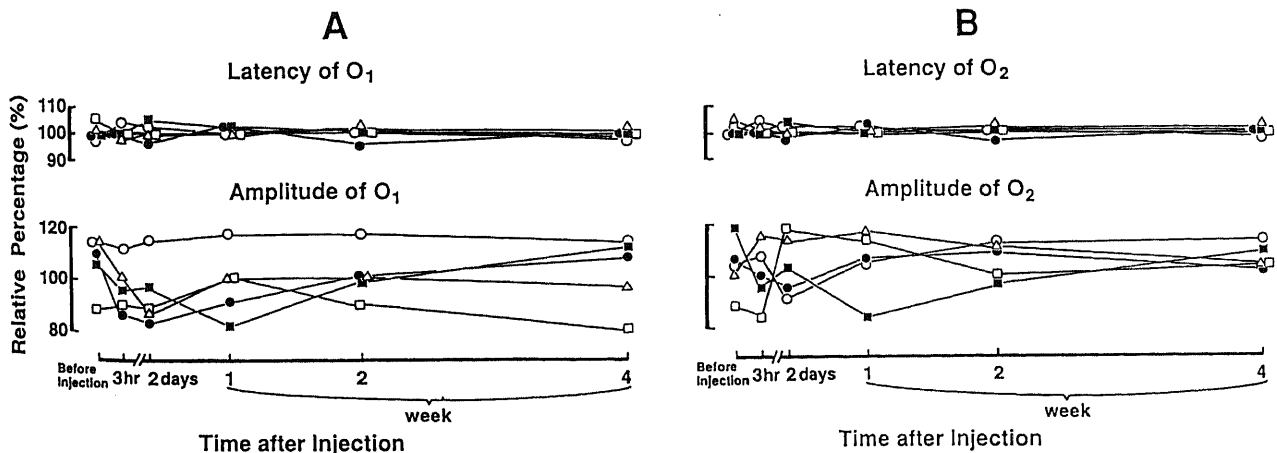


Fig. 51. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential (A,  $O_1$ ; B,  $O_2$ ) by an intravitreal injection of 80 µg GM 4 weeks after vitrectomy in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 49.

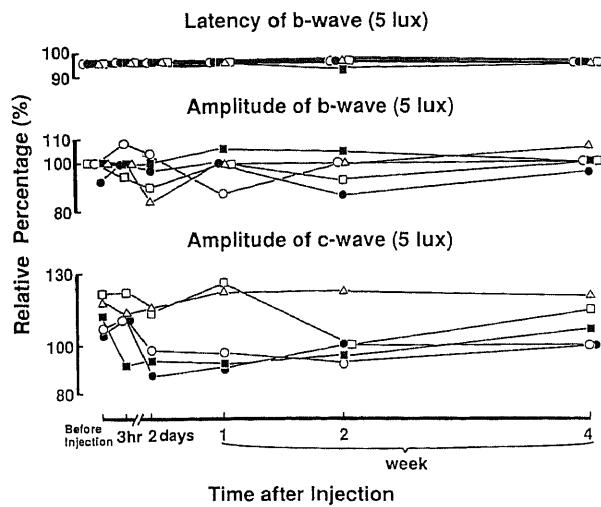


Fig. 52. Changes of the latency and amplitude of the b-wave (top, middle) and the amplitude of the c-wave (bottom) by an intravitreal injection of 80  $\mu\text{g}$  GM 4 weeks after vitrectomy in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea. Other conditions were the same as in Fig. 49.

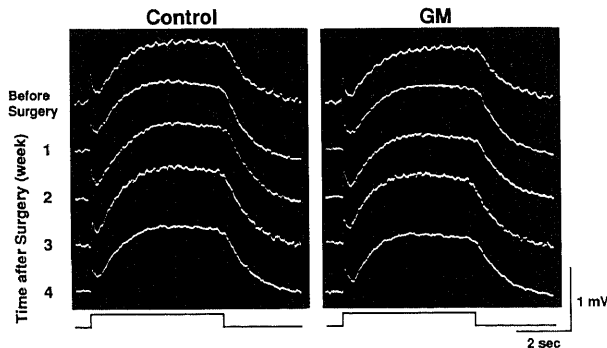


Fig. 53. Effects of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GM in an intravitreal irrigation solution on the ERG of a pigmented rabbit. The b- and c-waves were not deteriorated. A single rectangular stimulus light was used. Direct-coupled amplification. Stimulus intensity, 5 lux at the cornea. Stimulus duration, 5 sec.

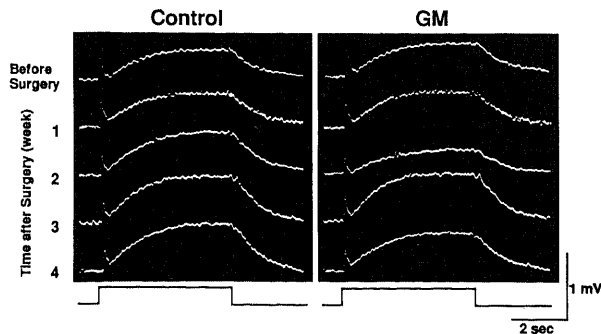


Fig. 54. Effects of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GM in an intravitreal irrigation solution on the ERG of an albino rabbit. The b- and c-waves were slightly reduced by 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GM 2 weeks after surgery. The b- and c-waves recovered within 3 weeks. Other recording conditions were the same as in Fig. 53.

越える塩酸ケタミンを投与する必要がある, その場合塩酸ケタミンの ERG におよぼす影響が顕性化し<sup>40</sup>, ERG 記録には上記投与量を越える塩酸ケタミンによる麻酔は不適であろう. 一方, ウレタンはウサギでは 1g/kg 以上の投与で ERG b波の減弱を惹起させるという<sup>39</sup>. また成熟途上の白色ラットではウレタン (124mg/100g) 頻回投与により組織学的に RPE の障害がみられたが, 成熟したラットでは障害が認められなかったとい

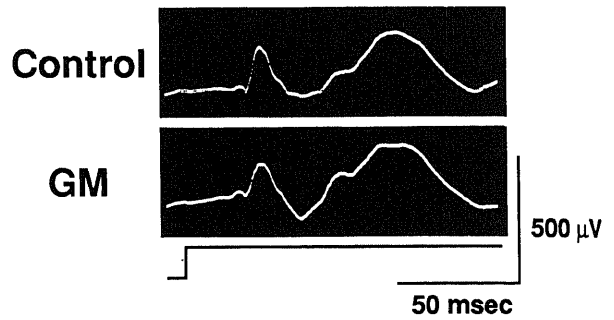


Fig. 55. Effects of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GM in an intravitreal irrigation solution on the VEP of an albino rabbit. The initial positive responses of the VEP were unchanged 4 weeks after surgery. The upper and lower traces show the responses to the stimulation of the control eye and the GM-injected eye respectively. Responses from the same rabbit as in Fig. 54. For other recording parameters see the legend for Fig. 7.

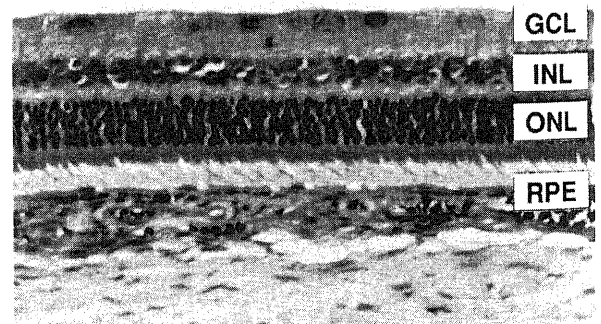
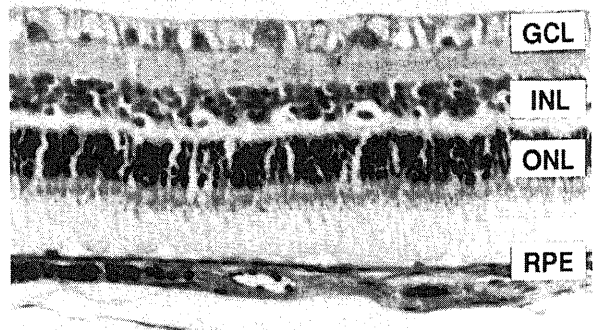


Fig. 56. Light micrograph of the retina of an albino rabbit 4 weeks after intravitreal irrigation with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GM. Top, control eye. Bottom, GM-irrigated eye. Light micrograph from the same rabbit as in Fig. 54. Magnification,  $\times 100$ . For explanation see the text. Other conditions were the same as in Fig. 8.

う<sup>58</sup>。以上の点を鑑み、本研究ではc波を観察するには成熟したウサギを用いウレタン投与量を200~400mg/kg/hrとし、c波を支障なく記録出来た。

前述した如く硝子体が炎症の主座となる細菌性眼内炎においても血液眼関門のために全身投与(静脈内注射または筋肉内注射)あるいは眼外に局所投与(結膜下注射,点眼など)された抗生剤の硝子体内濃度は一般に細菌性眼内炎の治療に有効な濃度に達せず<sup>112)</sup>、そのため上記投与方法では細菌性眼内炎の視力予後は極めて悪い<sup>65)66)</sup>。従って血液眼関門を越えて抗生剤を直接硝子体内に注入することは有効な硝子体内濃度を得る目的には誠に理に適っている。ゆえに本研究では临床上使用し得る

GM硝子体内注入量を決定することを目的としてGMを直接硝子体内に注入し、網膜に対する影響をERGを指標として検討した。また細菌を抗生剤に短時間接触させた後に細菌の増殖が一定時間抑制される現象(postantibiotic effect, PAE)が近年注目されている<sup>67)68)</sup>。それによるとAGsではβラクタム系抗生剤に比しPAEが長く、グラム陰性菌に対してもPAEがみられ、結果的にAGsでは薬剤の投与間隔を長くすることが出来るという<sup>67)</sup>。従って、AGsでは投与量依存性の効果を示すことから原因菌に対して必要十分でかつ網膜に影響を与えない最高濃度を硝子体内注入することは細菌性眼内炎の治療に有効であろう。

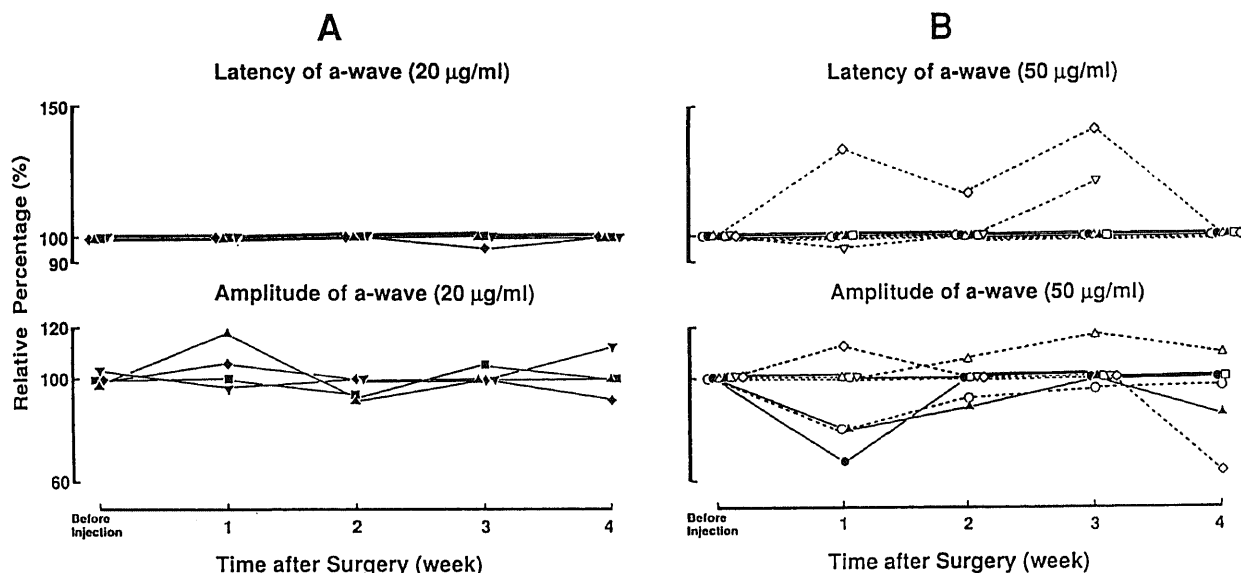


Fig. 57. Changes of the latency and amplitude of the a-wave by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. In graphs A and B the concentrations of GM in irrigation solutions were 20 µg/ml and 50 µg/ml, respectively. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea in this figure and Figs. 58, 59, 60, 61, 62. Broken and solid lines pertain to the eyes which underwent lensectomy-vitrectomy and only vitrectomy respectively in this figure and Figs. 58, 59, 60, 61, 62, 63. The same symbols indicate the same rabbits in this figure and Figs. 58, 59, 60, 61, 62, 63.

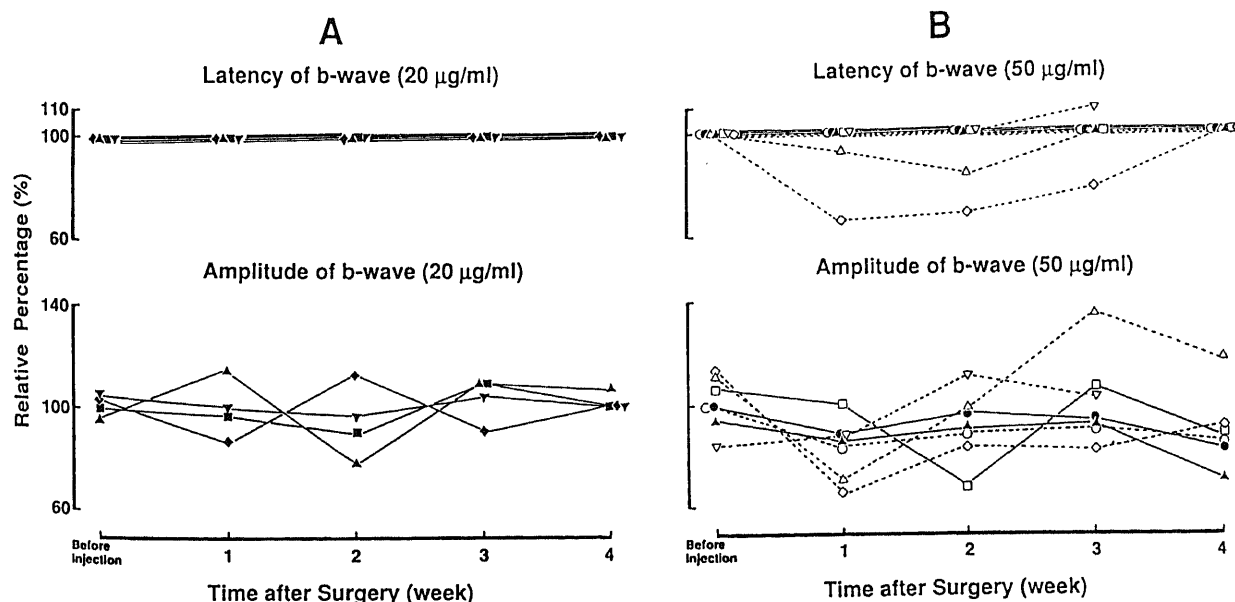


Fig. 58. Changes of the latency and amplitude of the b-wave by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 57.

AGs はペニシリン系抗生剤およびセフトロキサロム系抗生剤と異なりメラニン色素に高い親和性を有する<sup>69)70)</sup>。従って被験網膜のメラニン色素の有無によって実験成績が異なる可能性があると思念される。この点を考慮し本研究ではメラニン色素を有する有色ウサギと有さない白色ウサギについて検討したが、今回の実験成績(図24~27)から、網膜のメラニン色素の有無はGMにおいてはERG所見には影響しないと推定される。またGMはライソゾームにも高い親和性を有し<sup>11)17)172)</sup>、網膜内特にRPEにはライソゾーム<sup>73)</sup>およびメラニン色素が高濃度に存在することから、本研究では網膜におよぼすGMの影響を評価する指標としてRPEを主な発生源とするc波を記録した。

ウサギにおけるGMの硝子体内注入後3時間までの急性実験によって、注入量80 $\mu$ gはERG(a波, b波, c波およびOP)を変化させないが、240~400 $\mu$ gはa波, b波, c波およびOPに影響を与えることを見出した(図9~18)。慢性的観察ではGM80 $\mu$ gは硝子体内注入後8週までa波, b波, c波およびOPをほとんど変化させず(図22, 28~31), GM160 $\mu$ gは硝子体内注入後2週目まで調べたウサギ5匹中2匹でERGを消失させた(図24~27)。またGM200 $\mu$ gは注入後1週でa波, b波およびOPを軽度減弱または遅延させるとともにc波を消失させることが判明した(図32)。さらにGM240 $\mu$ gでは硝子体内注入後2週目まで調べた4匹全例のa波, b波およびOPが消

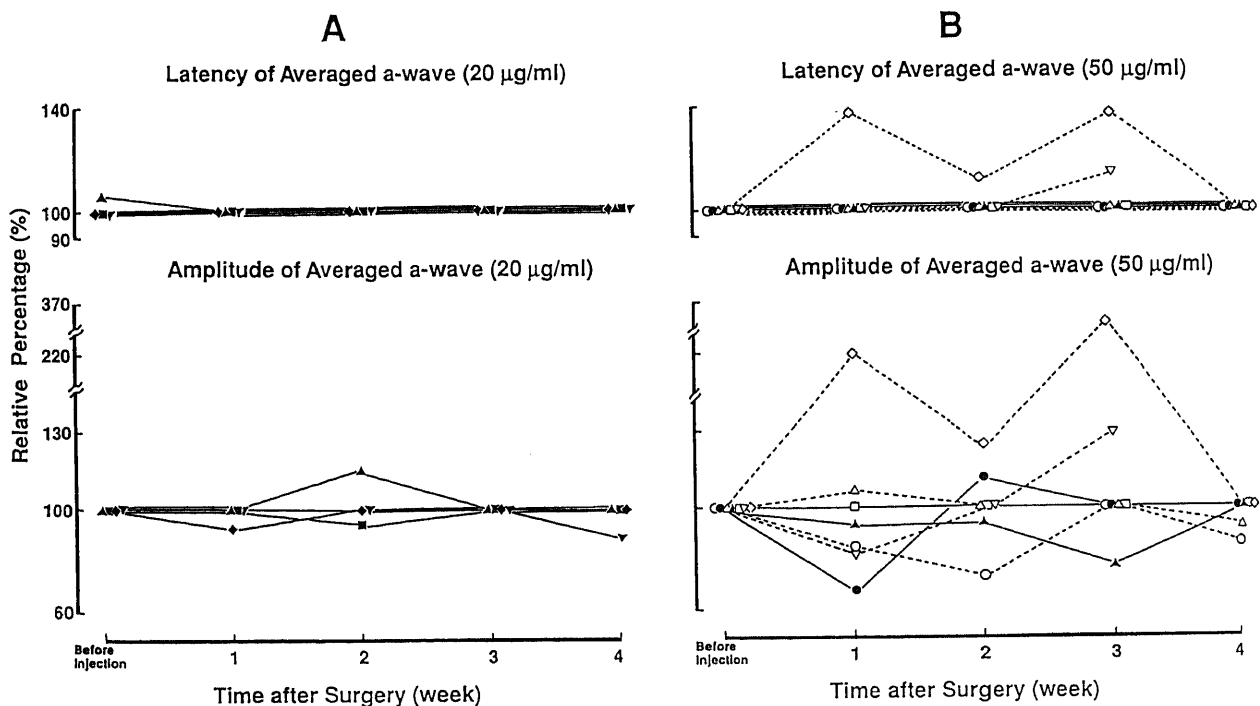


Fig. 59. Changes of the latency and amplitude of the averaged a-wave by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 57.

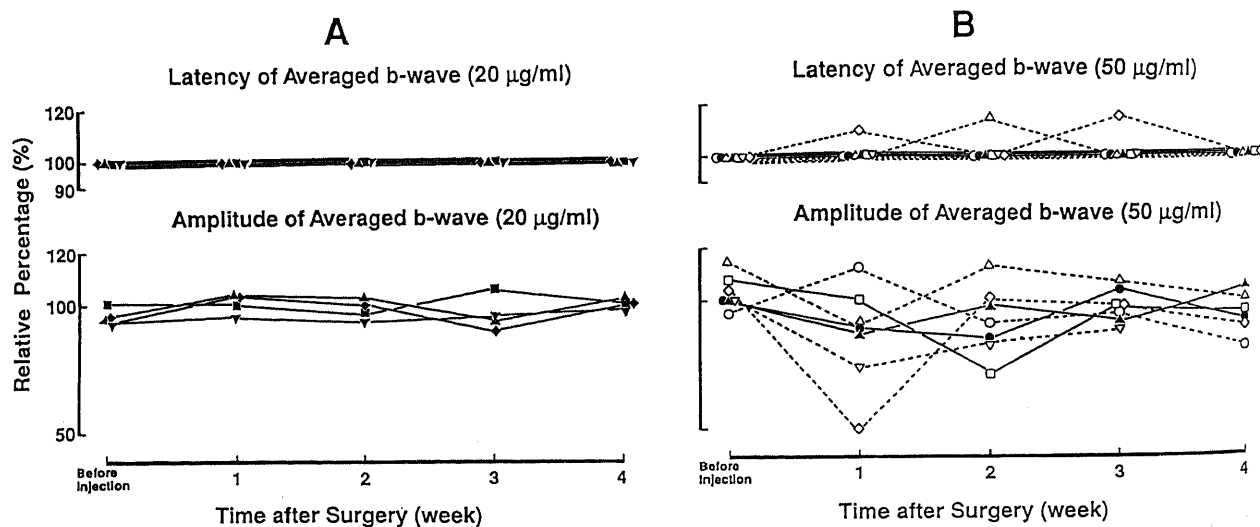


Fig. 60. Changes of the latency and amplitude of the averaged b-wave by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 57.

失した(図23). すなわち GM 160 $\mu$ g 以上の硝子体内注入は網膜に対して毒性を有し, 網膜機能を永続的に障害することが判明した.

GM 200 $\mu$ g は注入後1週でb波およびOPを軽度で減弱させc波をも消失させた(図32)から, この注入量は網膜に対して影響を与え得ると判断される. さらに注入後1週間でb波が比較的保存されるのに対しそれに続く角膜側陰性の緩徐な波形がみ

られ, その後その陰性波は2週目で平坦化し, 4週目以降で次第に角膜側陽性の波形がみられたという所見(図32)は以下の如く解釈される. すなわち1週目ではRPEが強く障害されたためERG c波のうちRPE成分(角膜側陽性)が著減し, それに対して残存し得た神経網膜成分(slow PIII, 角膜側陰性)が角膜側陰性の緩徐な波形をもたらし, 2週目ではRPE成分とslow PIIIとが相殺したのでc波は平坦化し, それ以降では

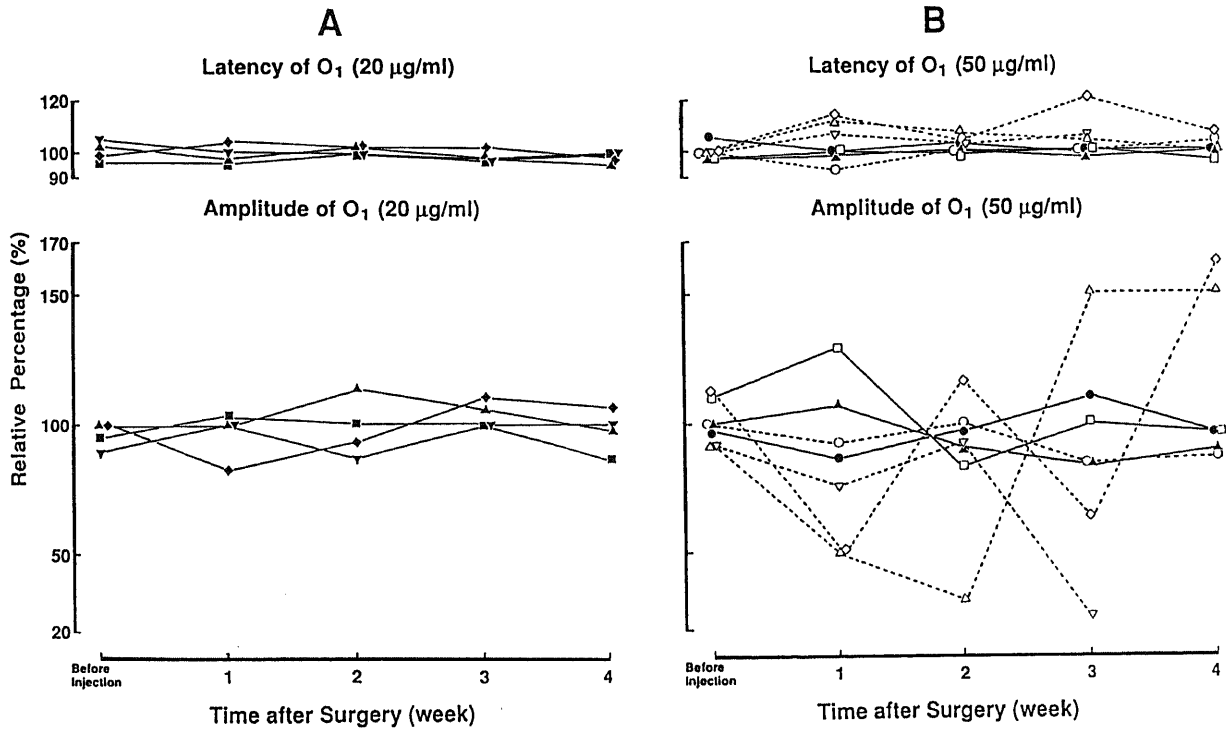


Fig. 61. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential ( $O_1$ ) by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 57.

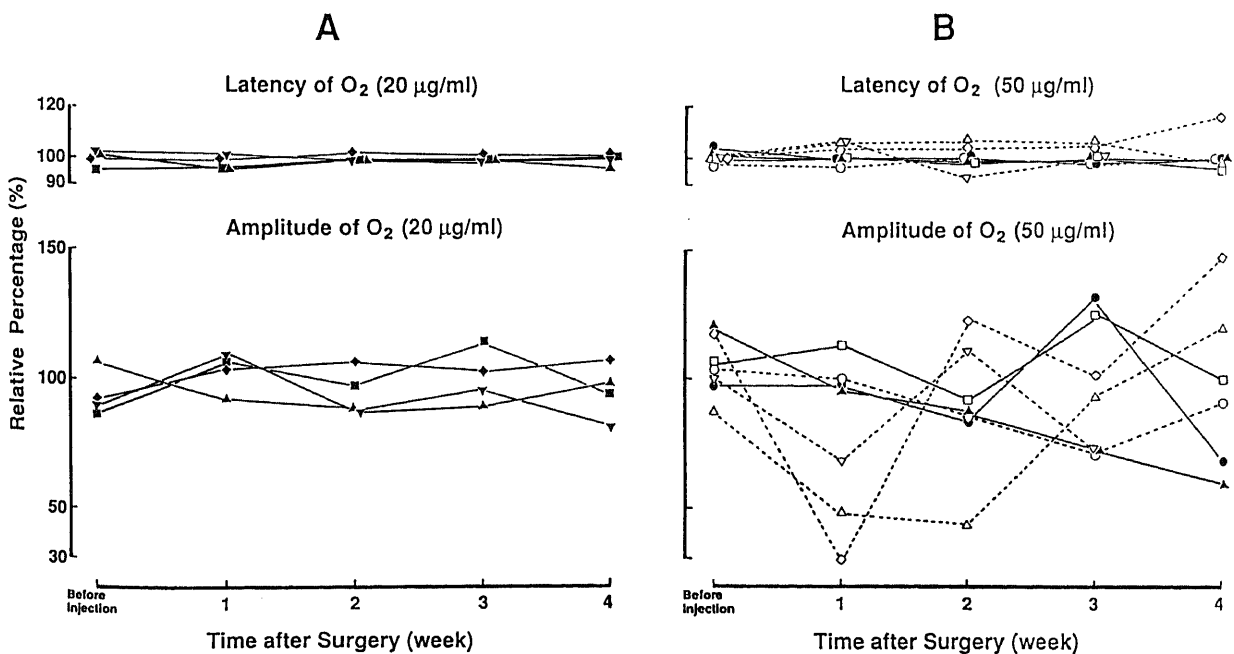


Fig. 62. Changes of the latency and amplitude of the oscillatory potential ( $O_2$ ) by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. Other conditions were the same as in Fig. 57.

RPE 成分の回復とともに角膜側陽性の ERG c 波が出現してきたとの解釈が可能であろう。さて D'Amico ら<sup>11)</sup>はウサギで GM 200 $\mu$ g の硝子体内注入は RPE 細胞のライソゾーム内に複合脂質 (complex lipid) の沈着を来し、視細胞外節の破壊を伴う網膜下腔へのマクロファージの侵入による RPE の破壊を惹起すると報告した。従って ERG で認められた RPE 障害を引き起こす GM 投与量 (200 $\mu$ g) (図32) は D'Amico ら<sup>11)</sup>の報告中の組織学的 RPE 障害を起こす GM 投与量とよく一致する。

硝子体内に注入された GM は注入初期には最も高濃度に視神経節細胞へ影響する可能性がある。しかし ERG は特殊な刺激方法を用いないかぎり、視神経節細胞層の活動を反映しない

とされている<sup>74)</sup>。この点を補足する目的で本研究では GM 硝子体内注入による上位視路の光誘発応答を VEP の早期成分を指標として検討した。AGs による耳毒性 (第 8 脳神経障害) 発現問題<sup>75-77)</sup>から推しても GM の視神経節細胞への影響が憂慮されたが、GM 80 および 400 $\mu$ g の硝子体内注入後 2~3 時間では、特に GM 400 $\mu$ g 注入では b 波振幅の減少がみられたにもかかわらず (図17)、VEP の早期成分はほとんど変化しなかった (図20)。また GM 80 $\mu$ g では注入後 4 週目の VEP において対照刺激眼と GM 注入眼刺激との間で差は認められなかった。ゆえに今回 GM 硝子体内注入前後の視神経の直接応答を検討していないが本研究での成績を勘案すると、GM 80 $\mu$ g 硝子体内注

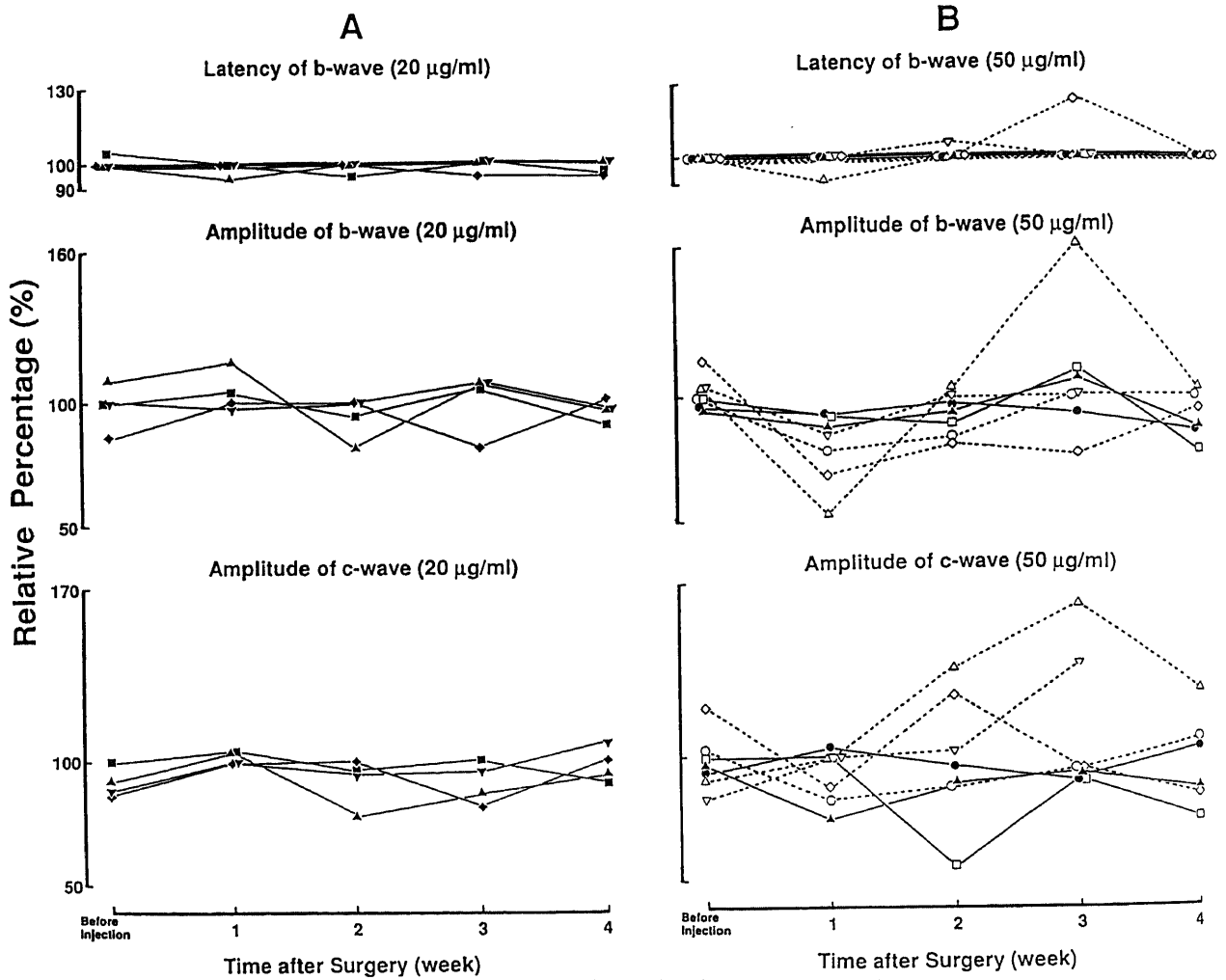


Fig. 63. Changes of the latency and amplitude of the b-wave (top, middle) and amplitude of the c-wave (bottom) by vitrectomy using an intravitreal irrigation solution containing GM in albino and pigmented rabbits. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea. Other conditions were the same as in Fig. 57.

Table 7. GM concentrations in vitreous humor, aqueous humor and serum one hr after an intramuscular injection of 5 mg/kg GM

		GM Concentration							
		Time after Vitrectomy or Lensectomy & Vitrectomy							
Non-Lensectomized, non-Vitrectomized Eye		Immediately		1 day		1 week		4 weeks	
		Vitrectomized Eye	Lensectomized & Vitrectomized Eye	Vitrectomized Eye	Lensectomized & Vitrectomized Eye	Vitrectomized Eye	Lensectomized & Vitrectomized Eye	Vitrectomized Eye	Lensectomized & Vitrectomized Eye
Vitreous	ND (5)	ND (4)	1.9±2.8* (4)	ND (4)	ND** (4)	ND (5)	0.5±0.5 (4)	ND (4)	1.0±0.2* (4)
Aqueous	1.2±0.9 (5)	3.3±1.7 (4)	4.3±1.6* (4)	1.6±0.9 (4)	1.1±0.5** (4)	0.9±0.5** (5)	1.9±2.1 (4)	0.6±0.1** (4)	1.9±0.9** (4)
Serum		7.6±2.3 (22)							

Values are the mean  $\pm$  SD ( $\mu$ g/ml). ND, not detectable. Number of eyes (vitreous, aqueous) or number of rabbits (serum) is indicated in parenthesis. \*, p<0.05 versus non-vitrectomized eye group. \*\*, p<0.05 versus immediately-after-surgery group (vitrectomized or lensectomized & vitrectomized).

入では視神経節細胞を含め網膜には本質的影響は少ないと推定される。

Peyman ら<sup>9)</sup>は有色ウサギを用い、検眼鏡所見、光頭および ERG を指標として GM の硝子体内注入後 5 カ月まで観察し、GM 500 $\mu$ g (ウサギ硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は約 294 $\mu$ g/ml) が安全な硝子体内注入力であると報告した。Bennett ら<sup>4)</sup>は GM 硝子体内注入前後の変化を光頭および ERG (b 波) を指標としてヨザルで観察し、500 $\mu$ g (ヨザル硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は約 167 $\mu$ g/ml) では光頭および ERG とともに異常を来さず、500 $\mu$ g を GM の安全な硝子体内注入力とした。また Ling ら<sup>7)</sup>はカニクイザルを使用し検眼鏡、光頭、電頭および ERG (b 波) 所見を指標として GM 400 $\mu$ g (カニクイザル硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は約 133 $\mu$ g/ml) 硝子体内注入後 1 カ月まで観察したところ、上記の濃度では網膜に何ら異常を認めなかったと報告した。しかし実験動物の差(サルとウサギ)はあるが、本研究の結果例えば GM 240 $\mu$ g (ウサギ硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は約 141 $\mu$ g/ml) では硝子体内注入後 2 週目までに ERG は消失したこと (図 23) を考慮すると、上記 3 報告<sup>4,7,9)</sup>における GM の許容濃度すなわち GM 400 $\mu$ g<sup>7)</sup> および 500 $\mu$ g<sup>4,9)</sup> (約 294 $\mu$ g/ml<sup>9)</sup>, 167 $\mu$ g/ml<sup>4)</sup> および 133 $\mu$ g/ml<sup>7)</sup> は網膜に十分に影響を与えうる有害な濃度ではないかと憂慮される。Zachary ら<sup>8)</sup>は、有色ウサギを使用し光頭および ERG (b 波) を指標として商用 GM (Garamycin<sup>®</sup>, シェリング, サフォーク, 英国) を硝子体内注入しその慢性的影響を GM 注入後 11 週まで検討したところ、GM 100 $\mu$ g (ウサギ硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は約 59 $\mu$ g/ml) では、10 眼中 3 眼で ERG の消失および光頭的に RPE の異常を認めたが、GM 50 $\mu$ g (ウサギ硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は約 29 $\mu$ g/ml) では光頭および ERG に何ら異常を認めなかったと報告した。また Palimeris ら<sup>10)</sup>は、検眼鏡、光頭および ERG (b 波) 所見を指標として商用 GM (Garamycin<sup>®</sup>, シェリング) を有色ウサギの硝子体内に注入した後 3 カ月までその毒性を観察したところ、GM 100 $\mu$ g では 8 眼中 2 眼で ERG の減弱を、GM 50 $\mu$ g では 10 眼中 2 眼で対照波形の 50% までの b 波振幅の減少を認めたが、検眼鏡および光頭では上記いずれの濃度でも異常を認めなかったと報告した。さらに、彼ら<sup>10)</sup>は臨床応用に際しては細菌性眼内炎が非常に重篤な病態を呈することを鑑み、ヒトにおいては GM 100 $\mu$ g 硝子体内注入 (ヒト硝子体内に均等に拡散したとした場合の硝子体内 GM 濃度は 25 $\mu$ g/ml) が適切であると述べた。従って本研究の GM 硝子体内注入のウサギ ERG を変化させない注入力 80 $\mu$ g は上記 2 報告<sup>4,9)</sup>の GM の許容注入力にほぼ近似した値となる。ところで上記 2 報告<sup>4,9)</sup>は商用 GM を使用し、前述の賦形剤を含有している。すなわちこの賦形剤による網膜毒性も想定される。この点を鑑み、本研究では研究用原末の他に商用 GM を一部の慢性実験に用いた。その結果、例えば GM 160 $\mu$ g 注入実験では 5 匹中の 2 匹に研究用原末を、他の 3 匹に商用 GM を用いたが、ERG 所見には研究用原末と商用 GM との間でほとんど差は認められなかった (図 24~27)。ゆえに賦形剤の網膜への毒性は今回調べたかぎりでは例えあったとしても僅かなものと推定される。

本研究では GM 80 $\mu$ g は硝子体内注入直後から注入後 8 週ま

で、a 波、b 波、c 波および OP を変化させず (図 22, 24~28)、VEP の早期成分もほとんど変化させないことが判明した (図 21A)。この濃度が眼内炎の原因菌に対して有効に抗菌力を発揮するかを以下で検討する。眼科領域で眼内炎の原因菌として *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* などが重要視されている<sup>18)~20) (8)~(9)</sup>。GM の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) は *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* に対してそれぞれ 0.2,  $\leq$ 0.1, 0.39, 1.56 $\mu$ g/ml である<sup>21)</sup>。検眼鏡の検査 (眼底撮影および蛍光眼底造影) (図 30, 31), 電気生理学的検査 (ERG および VEP) (図 22, 28) および組織学的検査 (光頭) (図 29) に異常を来さない GM 硝子体内注入力 80 $\mu$ g は約 1.7ml のウサギ硝子体内に均等に拡散すると仮定すれば硝子体内濃度約 47 $\mu$ g/ml に相当するから、この濃度 (47 $\mu$ g/ml) と上述の MIC との比は *Staphylococcus aureus* では 235, *Staphylococcus epidermidis* では  $\geq$  470, *Klebsiella pneumoniae* では 121 および *Pseudomonas aeruginosa* では 30.1 に達する。しかしながらウサギにおいて電気生理学的および組織学的に網膜に異常を来さないとされる GM 投与量 (80 $\mu$ g, ウサギ硝子体内に均等に拡散した場合の硝子体内濃度は 47 $\mu$ g/ml) を硝子体内容積 (ヒト約 4ml, ウサギ約 1.7ml) に比例させる単純計算で求められる量の GM (188 $\mu$ g) をそのまま臨床に使用することは無論出来ない。米村ら<sup>22,23)</sup>によるとウサギ網膜では内顆粒層が比較的薄く、ヒトでは内顆粒層は厚く細胞も密に配列しているという。また網膜血管はウサギでは髄翼にのみ分布し、ヒトではほぼ網膜全体に分布している<sup>24)</sup>。ゆえにウサギとヒトでは網膜にこのような解剖学的差異がある<sup>22)~(24)</sup>ことを考慮に入れると、網膜に対して毒性を回避し、しかもヒト細菌性眼内炎の治療に有効な硝子体内注入力としては GM 100 $\mu$ g を凌駕すべきでないと考えられる。またこの硝子体内注入力ヒト硝子体を 4ml とし注入力剤が硝子体内に均等に拡散した場合 25 $\mu$ g/ml の硝子体内濃度に相当し、上述の MIC<sup>21)</sup>を十分に凌駕する。

次に細菌性眼内炎に対する GM 臨床応用の報告について述べる。現在は大きく二派に別れる。一方は Peyman を中心とする一派<sup>19)</sup>で GM 400 $\mu$ g 硝子体内注入を推奨する。彼ら<sup>19)</sup>は実際の臨床でも GM 400 $\mu$ g およびデキサメサゾン 400 $\mu$ g を硝子体内注入し、視力の改善を認め、ERG は正常範囲にとどまったと報告した。他方は Zachary と Forster<sup>8)</sup> および D'Amico<sup>11)</sup> を中心とする一派で GM 100 $\mu$ g を適切な硝子体内注入力としてあげている。この GM 濃度を細菌性眼内炎に使用し、GM による網膜毒性を起こさずに治療に奏効した報告例もいくつか散見される<sup>17) (18) (20)</sup>。

さて文頭にも述べたように最近、GM による網膜障害と思われる報告が二三見受けられる<sup>25)~(26)</sup>。Snider ら<sup>25)</sup>は GM 20~40mg を不注意にも硝子体内に注入した 2 症例を報告した。両症例とも急性の網膜虚血性変化が生じ、1 例は光覚を維持したが残り 1 例は光覚を失ったという。McDonald ら<sup>26)</sup>は GM を硝子体内に投与後、重篤な網膜虚血性変化が生じた 5 症例を報告した。5 症例中 3 例は誤って多量の GM (20~40mg) が硝子体内注入された例であった。残り 2 症例は文献的に奨励されている投与量<sup>19)</sup>を使用した例であった。すなわち 1 例は Peyman ら<sup>19)</sup>が推奨する GM 400 $\mu$ g を眼内異物除去後にクリン



ダマイシン 250 $\mu$ g とともに硝子体内注入し、術後32時間後に散在する網膜出血と黄斑部の浮腫が認められ、6ヵ月後には視力が10/200であった症例である。残り1例は眼内レンズ移植術後に生じた細菌性眼内炎に最初 GM 100 $\mu$ g およびセファゾリンナトリウム (cefazolin sodium, CEZ) 2.25mg を硝子体内注入したが症状が改善しないので、注入後4日目に眼内レンズの除去および前部硝子体に対して眼内灌流液 (BSS<sup>®</sup>) に GM 8 $\mu$ g/ml を添加し硝子体切除術を施行した。硝子体手術後、GM 400 $\mu$ g を硝子体内注入したところ術直後に網膜に黄斑浮腫および出血を伴った網膜静脈分枝閉塞症がみられ、術後10ヵ月の視力は指数弁であったという。Conway ら<sup>24</sup> は *Staphylococcus epidermidis* に起因した細菌性眼内炎の2症例に硝子体切除後 Peyman らの勧める GM 400 $\mu$ g, CEZ 1mg およびデキサメサゾン 320 $\mu$ g<sup>1516</sup> を硝子体内注入したところ、眼内炎は治癒したが2症例とも黄斑梗塞 (macular infarction) が発生したという。一方、Conway ら<sup>85</sup> は GM 硝子体内注入による網膜障害と思われる上記3報告<sup>23~25</sup> を鑑み、オマキザルを用い GM の網膜に対する毒性を組織学的 (光顕および電顕)、検眼鏡および蛍光眼底造影所見を指標として検討した。GM 1000~3000 $\mu$ g (約500~1500 $\mu$ g/ml, オマキザルの硝子体容積は約2ml という<sup>85</sup>) では注入後3日目に黄斑梗塞が生じ、組織学的には視神経線維、視神経節細胞および網膜内層の著しい障害が認められたが、網膜外層および RPE の障害程度は軽度であったという。また黄斑梗塞の発生機序として、大量の GM が神経網膜とりわけ網膜内層に炎症を惹起させ二次的に網膜毛細血管に作用し血管の閉塞が生じると推定した。Brown ら<sup>86</sup> はアカゲザルを用い商用 GM 10mg を硝子体内注入し網膜変化を蛍光眼底造影、組織学的検査 (光顕および電顕) および電気生理学的検査 (ERG b波) を指標として検討した。硝子体内注入5分後には眼底は桜実紅斑 (cherry-red spot) を伴う白色化を呈し、20分後の蛍光眼底造影では多発する小さな蛍光の漏れはみられたが脈絡膜および網膜の動脈造影はほぼ正常であった。ERG では硝子体内注入後5分ではb波の著明な減弱がみられ注入後90分ではERGは消失し注入後11日目においても消失した状態であった。硝子体内注入後4.5時間の電顕像ではミューラー細胞の壊死、視細胞の種々の程度の細胞核萎縮、網膜内層のミトコンドリアの膨化がみられた。これらの変化とは対照的に RPE および脈絡膜血管における変化は軽度であった。注入後11日目の電顕像では広範囲の網膜内層の壊死と比較的保たれた網膜外層が特徴的であったという。以上の結果は Conway ら<sup>85</sup> の仮説すなわち GM の網膜毒性は最初神経網膜とりわけ網膜内層に生じ二次的に網膜血管に作用し血管の閉塞が生じるとの仮説を支持するという。しかしながら彼らの報告<sup>85,86</sup> は黄斑梗塞の発生機序の解明の一助になったとは思われるが使用した GM 注入量は大量であり、臨床症例において網膜毒性が惹起された硝子体内注入量 GM 400 $\mu$ g<sup>23~25</sup> を用いて同様の網膜変化を捉える必要があろう。また硝子体切除された眼では網膜の GM に対する感受性が変化し、網膜毒性が惹起されやすいのではないかとこの疑問が生じる。その解決の一步として本研究にて硝子体切除眼に正常眼において電気生理学的および組織学的に安全な硝子体内注入量である GM 80 $\mu$ g (図22, 28) を投与したところ、硝子体内注入後4週まで電気生理学的および組織学的に異常がみられなかった (図46~52)。加えて Talamo ら<sup>13</sup> は有色ウサギを用い水晶体囊外摘出術を施行した群あるいは水晶体切除術および硝子

体切除術を施行した群ではこれらの手術を施行しない群に比べて GM 100~4000 $\mu$ g 硝子体内注入した際の、GM の網膜毒性の閾値が変化するか否かを検眼鏡所見および組織学的所見 (光顕および電顕) を指標として検討した。その結果、上記の手術を施行した群において網膜におよぼす GM 毒性閾値は非手術眼において同量の GM が硝子体内注入された場合と同程度であった。ゆえに GM の網膜への毒性は薬剤が組織に作用している時間よりむしろ硝子体内の薬剤ピーク濃度に依存すると結論づけた<sup>13</sup>。彼らの報告<sup>13</sup> および本研究の結果 (図46~52) から推して水晶体あるいは硝子体の有無は GM の網膜への毒性に関してほとんど影響しないのではないかと推定される。

一方、GM の網膜毒性の発症を GM 濃度調製過程で生じた人為的誤ちあるいは硝子体内注入法の誤りとして捉えている報告がある<sup>87~90</sup>。事実 Jeglum ら<sup>87</sup> は医師8名および薬剤師4名に商用 GM 40mg/ml を用いて 400 $\mu$ g になるように GM 注入液を調製させたところ、その GM 濃度は医師では 74~904 $\mu$ g (平均 484 $\mu$ g)、薬剤師では 417~488 $\mu$ g (平均 443 $\mu$ g) であったという。従って薬剤の調製は専門家 (薬剤師) に任せるべきであると警告した<sup>87</sup>。Caskey ら<sup>88</sup> も GM 硝子体内注入液希釈の際のばらつきによる医原性網膜障害を指摘した。Noske<sup>89</sup> は注入液調製方法として商用 GM (40mg/ml) 1ml を 1ml 注射器に吸引し、10ml 注射器に希釈液 9ml と混ぜよく振盪し、1ml 注射器を用いてそのうち0.1ml を硝子体内注入するのが最も正確であると報告した。しかし GM 400 $\mu$ g 硝子体内注入による網膜毒性を報告した Conway ら<sup>85</sup> は彼らの注入液濃度の正確性は97~105% (平均101%, SD 3.1%) であり、上記薬剤調製過程での誤りを否定し、GM 400 $\mu$ g 硝子体内注入の危険性を改めて説き、手術場で執刀医自らが注入液を調製すべきであるとした。本研究では主に原末を使用し、以上の報告と簡単に比較は出来ないが注意深く原末を定量し 10ml オベガード<sup>®</sup> MA に溶解した。商用 GM を使用した際には Noske の報告<sup>89</sup> とほぼ同様の方法で各濃度の注入液を調製した。ところで Peyman ら<sup>9</sup> は白色ウサギ無水晶体眼において注射針の切り口を前房側または網膜側に向け GM を硝子体内注入したところ、切り口を網膜側にすると GM 30 $\mu$ g という少ない硝子体内注入量においても網膜毒性が認められたという。本研究では十分に上記報告<sup>9</sup> を鑑み、針の切り口を水晶体側に向け硝子体内中央にて緩徐に注入した。

Rowsey ら<sup>20</sup> は70例の眼内炎症例を経験し、治療開始前に ERG に著しい変化がみられる症例では視力予後が芳しくなかったと報告した。Forster ら<sup>18</sup> は細菌性眼内炎140例中抗生剤の硝子体内注入のみあるいは硝子体切除術を併用し抗生剤の硝子体内注入を行ったのち ERG 検査を施行した46例を検討し、a波よりb波がより強く障害される傾向があったと報告した。秦野ら<sup>91</sup> は白色ウサギ硝子体内に *Pseudomonas aeruginosa* を接種し眼内炎を発症させ、病像の経過および眼内生菌数の動態とともに ERG (a波およびb波) 変化を調べ、硝子体内接種2日後までに ERG は消失したがb波の減弱がa波の変化より先行して生じたと報告した。従って本研究の結果 (急性実験において GM 240 $\mu$ g 以上の硝子体内注入ではb波が特に減弱する所見) を考慮すると临床上ヒト細菌性眼内炎の治療の際に過剰な GM 硝子体内投与が行われると GM と眼内炎の原因菌とで相加あるいは相乗効果が生じ網膜に重大な障害を与えることが危惧される。ゆえに細菌感染に曝された網膜に対する薬剤の影響も今後検討する必要がある。加えて彼らの報告<sup>18,20,91</sup> から細

菌性眼内炎症例には ERG 検査がその病態の把握および視力予後の検討に非常に有効であることが示唆された。

当教室の大野木<sup>26)</sup>は白色ウサギの眼杯(網膜, 脈絡膜および強膜からなる)からの ERG (a 波, b 波, c 波および OP) の AGs 添加液灌流中の変化を対照浸漬液として長山第 II 液を用い検討した。その結果, GM 23 $\mu$ g/ml では b 波および OP は有意には変化しなかった。46 $\mu$ g/ml では b 波および OP は軽度減弱し, 184 $\mu$ g/ml では特に b 波は著明に減弱し, a 波および c 波の振幅が軽度増大したと報告し, b 波および OP に対する GM の最小作用濃度を 35 $\mu$ g/ml と述べた。従って本研究の硝子体内注入法の急性期の成績と大野木の摘出眼杯灌流法による成績<sup>26)</sup>を比較すると, ERG を変化させない GM 濃度は硝子体内注入法では摘出眼杯灌流法に比し約 2 倍であった。この成績の差異の原因として摘出眼杯灌流法では薬剤はほぼ直接的に網膜に対して作用し, しかもウサギ硝子体と比較すると灌流液の温度, pH および組成などが異なる<sup>26)</sup>のに対して, 硝子体内注入法では本研究の如く針先の切り口を水晶体側に向け緩徐に注入する手技<sup>9)</sup>が網膜に与える影響を軽減し, 硝子体の存在が衝撃吸収体 (shock absorber) として働くために間接的に薬剤が網膜に作用し, かつ硝子体が大きな緩衝能力を有する<sup>9)</sup>からと推定される。

硝子体内注入された GM は網膜のどの部位に作用し, また網膜に対してどのような作用をもつのか本研究の結果および二三の文献を通して以下に考察する。GM の作用機序は主として細菌の沈降定数 30S および 50S のリボゾームに結合し蛋白合成を阻害し殺菌的に作用するという<sup>9)</sup>。真核生物であるヒトでの蛋白合成では沈降定数 80S のリボゾームが主であるので GM のヒトリボゾームへの作用は少なくかつヒト細胞内への移行性は低いという<sup>9)</sup>。しかしながら原核細胞である細菌と同じ蛋白合成過程を有するであろうミトコンドリアにおいて GM の影響が懸念される。また Tabatabay ら<sup>9)</sup>は有色ウサギを用い GM 400 $\mu$ g を硝子体内注入し免疫電顕法にて GM の網膜細胞内局在を検討したところ, 注入後 24 時間で網膜全層の細胞質内に GM の局在が観察されたと報告したので, 網膜細胞内への GM の移行性はそれほど低くはないと推定される。AGs は細菌の表層とイオン結合するという<sup>9)</sup>。すなわち AGs は正電荷をもち細菌の表層の負電荷 (リン脂質, リポ多糖体, リポ・テイコ酸のリン酸残基) と結合する<sup>9)</sup>と考えられている。よって真核生物の細胞表面も負電荷を有するので細菌と同様なイオン結合が GM を硝子体内注入した際生じ得る。本研究の急性実験成績から GM では OP に比して b 波がより減弱し, しかも c 波が比較的保存されることが判明した (図 16, 図 17)。一方, 摘出眼杯灌流法においても GM によって c 波および OP に比して b 波

が著明に減弱したという<sup>26)</sup>。よって硝子体の有無にかかわらず得られた ERG 変化は作用濃度の若干の違いはあるが硝子体内注入法と摘出眼杯灌流法との間で同様であったことから, 急性期での GM の網膜に対する作用部位はウサギ生体と摘出眼杯とでほとんど同じではないかと推測される。従って上述したイオン結合が網膜内特にミュラー細胞あるいは双極細胞膜に生じ, 機能的変化として ERG b 波の著明な減弱として観察された可能性が考えられる。また上述の Tabatabay ら<sup>9)</sup>は有色ウサギを使用し GM 400 $\mu$ g 硝子体内注入後の網膜および脈絡膜における GM の局在を蛍光抗体法 (間接法) を用いて検討し, GM 硝子体内注入後 8 時間で RPE を除く網膜全層に GM の存在が認められ, 注入後 12 時間で主として RPE および脈絡膜血管に GM が検出された。注入後 36 時間ではほとんど RPE および脈絡膜血管のみが染色され, 同様な染色所見が注入後 48 時間においても認められたという。ゆえに本研究の成績すなわち GM 400 $\mu$ g の硝子体内注入後 3~4 時間では b 波が減弱するにもかかわらず c 波がある程度保存された所見, および彼ら<sup>9)</sup>の GM の経時的局在所見から推して注入後 3~4 時間では GM はほとんど RPE に到達せず GM の影響が RPE には惹起されないと推定される。加えてこのような結果からも AGs の網膜への毒性を検討する際には慢性的な観察が必要であると考えられる。また前述の D'Amico らの報告<sup>11)</sup>の如く細胞の飲食作用あるいは他の機構により RPE 内のライソゾーム内に GM が集積し, その酵素活性を低下させ RPE の破壊, さらに視細胞の障害が生じることも考えられる。AGs は非脱分極型の神経・筋遮断作用を有しその発現機序は前神経筋接合部の膜において GM がカルシウムコンダクタンスを低下させるのでアセチルコリンの遊離が低下するためと考えられている<sup>9)</sup>。これと同様な機序, つまり網膜の細胞膜でカルシウムと GM の競合が生じ本研究でみられた ERG 変化 (b 波振幅の著明な減少) が観察されたと考えることも可能である。前述の如くメラニン色素は GM を非特異的に吸着する性質を有している<sup>69/70)</sup>ので, 薬物の眼内における蓄積や分布を論じる際には, RPE 内などに多く含まれるメラニン色素の存在の有無を無視出来ない。つまりメラニン色素が薬物を吸着後にその薬物を徐々に放出する一種の貯蔵所となりメラニン含有組織近傍での GM 濃度を高めることが予想される。従ってメラニン色素を有さない白色動物より有色動物では RPE における薬剤濃度が高くなりかつ長時間留まるので, 白色動物に比べ副作用の増加が考えられる。一方ではメラニンと結合した GM の抗菌活性の低下の報告<sup>69)</sup>があるのでメラニン色素によって GM の薬理作用が軽減される可能性もあり, GM とメラニンとの結合が GM による副作用発現を軽減することも否定出来ない。本研究では白色ウサギと有色ウサ

Table 8. Reported half-lives of intravitreal GM concentration after intravitreal injection

Author	Dose of GM ( $\mu$ g)	Half-life (hr)	Animal
Peyman et al <sup>19)</sup>	500	22.67	Albino Rabbit
Cobo et al <sup>50)</sup>	100	32	Albino Rabbit
Kane et al <sup>48)</sup>	50	24	Pigmented Rabbit
Barza et al <sup>51)</sup>	100	33	Rhesus Monkey
Ben-Nun et al <sup>62)</sup>	100	34.22	Cat
Present report	80	31	Albino Rabbit

ギとの間で GM 硝子体内注入後の ERG 変化に明らかな相異はみられなかったので、GM とメラニン色素の結合が ERG におよぼす影響は例えあっても僅かなものと推定される。

硝子体内に投与された GM の排出経路について若干の考察を加える。硝子体内の薬物が全て前房を介する前方排出路 (anterior route) から排出されると仮定した場合の Maurice による理論式<sup>49)</sup>を式 (1) に示す。式 (1) で kv は単位時間あたりの硝子体中からの薬剤の排出率 (%/hr), Cv は硝子体中の平均濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ), Vv は硝子体容積 (ml), f は単位時間あたりの房水流量 (ml/hr), Ca は房水中の平均濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を表す。

$$\frac{kv}{100} C_v V_v = f C_a \quad \dots\dots\dots(1)$$

f および Vv は一定値なので

$$kv = \frac{f (0.24\text{ml/hr})}{V_v (1.7\text{ml})} \times C_a / C_v \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式 (2) のように考えると、kv と Ca/Cv は比例関係にある。もし薬物が網膜を介する後方排出路 (posterior route) からも排出されている場合には式 (2) が成立しない。Ca/Cv $\times$ 100 は表 6 に示すように約 20% であり、この値を式 (2) に代入すると右辺は 2.82%/hr となる。一方、kv は硝子体内の GM 濃度変化の回帰式より求められ、2.24%/hr であり、式 (2) はほぼ成立し、この関係は主に後方排出路を介して眼外に排出されるという  $\beta$  ラクタム系抗生剤<sup>51)</sup>と異なり GM は主に前方排出路から排出されると考えられる。しかし Tabatabay ら<sup>52)</sup>が報告した GM 局在結果から明らかのように、硝子体内投与された全ての GM が前方排出路を介するのではなく、後方排出路からも GM は排出されると推定される。またメラニンと GM との親和性<sup>69)70)</sup>の観点から本研究の如く白色ウサギの結果のみで GM 硝子体内注入による眼内動態を論じるには慎重を要する。しかし GM 80 $\mu\text{g}$  硝子体内注入後の ERG 変化が白色ウサギと有色ウサギとの間ではほぼ同様であったこと、かつ GM 硝子体内注入後の眼内クリアランスに関する報告<sup>54)55)52)</sup>(表 8)、すなわち硝子体内 GM 濃度半減期を Peyman ら<sup>53)</sup>は約 23 時間 (白色ウサギ)、Cobo ら<sup>50)</sup>は 32 時間 (白色ウサギ)、Kane ら<sup>48)</sup>は 24 時間 (有色ウサギ)、Barza ら<sup>51)</sup>は 33 時間 (アカゲザル)、Ben-Nun ら<sup>52)</sup>は約 34 時間 (ネコ) と報告し、GM 硝子体内注入量、使用した動物の種および GM 濃度測定方法はそれぞれ異なるが、本研究において得られた半減期 (約 31 時間) とほぼ一致することなどから、GM とメラニンとの親和性<sup>69)70)</sup>による白色動物と有色動物との間の硝子体内 GM 濃度変化の違いは少ないと推定される。硝子体内 GM 濃度の経時的变化を前述した細菌性眼内炎主要原因菌に対する MIC<sup>81)</sup> (*Staphylococcus aureus*: 0.2 $\mu\text{g/ml}$ , *Staphylococcus epidermidis*:  $\leq$ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ , *Klebsiella pneumoniae*: 0.39 $\mu\text{g/ml}$ , *Pseudomonas aeruginosa*: 1.56 $\mu\text{g/ml}$ ) と比較すると、硝子体内 GM 濃度は硝子体内注入後に長期にわたって (100 時間以上) MIC を凌駕している。

Kane ら<sup>48)</sup>は有色ウサギを用い実験的に細菌性眼内炎を惹起させ硝子体内に GM 50 $\mu\text{g}$  を注入したところ硝子体内 GM 濃度の半減期は約 10~19 時間に短縮したと報告した (正常眼における半減期については表 8 参照)。Kawasaki ら<sup>82)</sup>は白色ウサギを用い硝子体切除時の眼内灌流液中に GM (46 $\mu\text{g/ml}$ ) を添加し硝子体切除眼では硝子体内 GM 濃度の半減期は約 12 時間であっ

たと報告し、また硝子体切除眼における Ca/Cv 値の検討結果に基づいて硝子体切除術は眼血液関門を障害し、これにより後方排出路からの GM の排出が促進されると推定した<sup>83)</sup>。Moreira ら<sup>80)</sup>は白色ウサギにおいて水晶体切除および約 30% の硝子体を切除した後直ちに 0.9% 生理食塩水に溶解した GM 50 $\mu\text{g}$  あるいは 0.8% ヒアルロン酸ナトリウムに溶解した GM 50 $\mu\text{g}$  を前部硝子体に注入し GM の眼内動態について検討した。その結果、各採取時間に測定した GM 濃度はヒアルロン酸ナトリウムに溶解した場合には生理食塩水に溶解した場合に比べ有意に高かったが、硝子体内 GM 濃度の半減期は上記 2 種の溶解液についてそれぞれ 3.3 時間、3.6 時間であり、半減期においては 2 種の溶解液間で有意差はみられなかったという<sup>84)</sup>。各採取時間で上記 2 種の溶解液間で GM 濃度に違いが生じた原因として生理食塩水中の GM が残留硝子体に混合される前に線維柱帯を介し GM が排出されたこと、眼球を摘出する際に縫合部を介して生理食塩水中の GM が漏出したことなどが考えられるという<sup>85)</sup>。以上の報告<sup>48)80)86)</sup>より実際のヒト細菌性眼内炎では硝子体内注入された抗生剤の硝子体内からの排出は眼血液関門の障害によって促進され、眼内での抗生剤の有効濃度が維持される時間は短縮されると推測される。よって前述の Moreira ら<sup>80)</sup>はヒト細菌性眼内炎の治療にあたって生理食塩水に溶解した GM を使用する際には薬剤をなるべく眼内に長期間留置させるために病変部のみ切除し出来るかぎり正常硝子体を残す方がよく、逆に全硝子体を切除した場合にはヒアルロン酸ナトリウムに溶解した GM を用いるべきであると報告した。しかしながら硝子体を残した際には増殖性硝子体網膜炎の発生に注意しなければならない。また一方では眼内での治療有効濃度を維持する手段のひとつとして薬剤の再注入が考えられる。Maurice<sup>49)</sup>は臨床上の再注入の時期として GM では 1 回目の硝子体内注入による初期 GM 濃度の 10% 以下になる 5 日目を推奨した。前述の Cobo ら<sup>50)</sup>はウサギ無水晶体眼においては硝子体内注入された硝子体内 GM 濃度の半減期は 12 時間に短縮されることから、ヒトでは再注入時期として無水晶体眼では 36~48 時間後に、有水晶体眼では 72~96 時間後が望ましいとした。Oum ら<sup>87)</sup>は有色ウサギにおいて塩酸バンコマイシン (vancomycin hydrochloride, VCM) および GM の複数回硝子体内注入の網膜への影響を調べる際に、48 時間おきに 2 回~3 回の硝子体内注入を行った。無手術操作のウサギを用いた本研究においては硝子体内注入後 72 時間の前房水内 GM 濃度 (表 5; 1.8 $\pm$ 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ) と *Pseudomonas aeruginosa* に対する GM の MIC (1.56 $\mu\text{g/ml}$ )<sup>81)</sup>を考慮し、再注入の時期を 72 時間後とした。

本研究では再注入後 18~53 日目まで網膜におよぼす影響を電気生理学的に検討したところ、調べた 8 匹全例で再注入後 4 日目に GM 80 $\mu\text{g}$  注入眼において a 波、b 波、c 波あるいは OP の各振幅の減少あるいは増大がみられたが、4 週目にはほぼ回復した (図 37, 38)。また調べた有色ウサギ 4 匹中 1 匹で再注入後 4 日目の眼底検査にてほぼ後極部に多数の小白斑がみられた (図 40)。前述の Oum ら<sup>87)</sup>は有色ウサギにおいて VCM 1mg および GM 100 $\mu\text{g}$  を 48 時間ごとに 3 回硝子体内注入したところ 9 眼中 4 眼で 3 回目の注入終了後 2~3 日目に眼底に多数の小白斑が観察され、1~2 週間後には小白斑はびまん性の斑状混濁 (mottling) を残して消失し、組織学的には RPE の障害が認められたと報告した。使用した抗生剤および GM 注入量は多少異なるが本研究で生じた白斑と彼ら<sup>87)</sup>が観察した小白斑と

はほぼ同種のものであろうと推定される。また Olson ら<sup>80</sup>は術後細菌性眼内炎40症例を検査し、12例で GM 100 $\mu$ g およびセファロリジン (cephaloridine, CER) 250 $\mu$ g または CEZ 2.25 mg の再注入を初回投与から24~72時間後に施行した。その12例中2例で検眼鏡的に GM の RPE への障害と考えられる網膜の萎縮および色素塊が認められたという<sup>80</sup>。再注入による網膜毒性についての記載はないが、Driebe ら<sup>78</sup>は眼内レンズ移植術後に生じた細菌性眼内炎83例の中で、初回の抗生剤 (GM 100 $\mu$ g および CER 250 $\mu$ g または CEZ 2.25mg) 硝子体内投与にても炎症が消退しないか初回の細菌培養にて病原性の強い菌が分離された20例で抗生剤 (初回と同じ種類でかつ同量) の再注入を初回注入後48時間目に施行し、その20例中18例で再注入の際に眼内の検体を再培養した。その結果、再培養18例中6例で培養陽性 (細菌性4例、真菌性2例) で、細菌による眼内炎4例中3例で抗生剤の再注入にもかかわらず光覚を失ったという<sup>78</sup>。Stern ら<sup>80</sup>は眼内レンズ、緑内障、角膜移植、斜視手術などの術後に生じた眼内炎26例中7例 (うち6例は硝子体切除術を併用した) に抗生剤 (GM 100~200 $\mu$ g および CEZ 2.25mg または VCM 1mg) の再注入を行ったが、抗生剤による網膜障害は1例もみられなかったという。しかしながら GM 80 $\mu$ g の硝子体内2回注入では電気生理学的検査において初回注入後4週目には回復傾向がみられたが初回注入後1~2週目前後で ERG が減弱したこと (図38)、検眼鏡的にも異常が捉えられたこと (図40)、再注入法という機械的操作による眼組織 (特に水晶体および網膜など) への障害の危険性が增大することおよび再注入の時期に未だに細菌培養が陽性である症例では視力の改善を期待しにくい<sup>78</sup> ことなどから推して、GM の再注入は臨床で出来るだけ避けるべきであり、再注入が必要である症例では硝子体切除術を選択することが望ましいと思われる。

ところで、細菌性眼内炎のような病的な眼内状態では眼血液関門の障害によって血中からの眼内への抗生剤の移行も亢進している可能性がある。西村ら<sup>100</sup>は硝子体切除術が施行された各種眼疾患においてフルオロフトメトリーを用い硝子体腔内の蛍光色素を測定したところ硝子体切除眼では基礎疾患の種類にかかわらず蛍光色素が硝子体内に急速に移行し、それは硝子体構造の破壊による眼血液関門の変化を反映していると報告した。林ら<sup>101</sup>は有色ウサギにおいて硝子体切除後7~9日目に GM 10mg の筋肉内注射を行い、注射後1時間の GM の硝子体内移行について検討した。その結果、硝子体切除眼における硝子体内 GM 濃度は  $0.52 \pm 0.37 \mu\text{g/ml}$  であり、非切除眼における濃度  $0.028 \pm 0.031 \mu\text{g/ml}$  に比して高値を示した。従って GM の硝子体内移行の増加が房水側からかあるいは網膜側からかは明らかではないが、硝子体切除により GM の硝子体内移行が促進されることが示された。この硝子体切除眼における硝子体内 GM 濃度 ( $0.52 \pm 0.37 \mu\text{g/ml}$ ) は *Pseudomonas aeruginosa* を除く他の眼内炎の主な原因菌に対する MIC を僅かながら凌駕していたという<sup>101</sup>。本研究においても GM 5mg/kg を全身投与した際の無処置眼、硝子体切除眼および水晶体切除ならびに硝子体切除眼への GM の硝子体内移行について検討した。その結果、無処置眼および硝子体切除術のみを施行した眼における硝子体中 GM 濃度は全ての時点で測定限界値以下であった (表7) が、水晶体切除術と硝子体切除術をともに施行した眼では手術後4週目においても硝子体内に GM が検出された (表7,  $1.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ )。この硝子体内 GM 濃度は上記報告<sup>101</sup>と同

様に *Pseudomonas aeruginosa* を除く他の眼内炎の主な原因菌に対する GM の MIC<sup>81</sup> を凌駕していた。本研究と林ら<sup>101</sup> の報告との間で実験上の硝子体手術などの手技および GM の濃度測定方法の差異はあるにしても、硝子体手術ならびに水晶体切除術によって GM の眼内移行が促進されることが明らかになった。また硝子体切除のみならず水晶体切除も行うことが薬剤の硝子体内移行促進という観点から利点であることが証明された。よってそのような観点から硝子体切除術により硝子体内移行が促進され抗生剤の術中の灌流液への添加や術終了時の眼内投与は必ずしも必要ではないという意見もある<sup>102</sup>。しかしながら一般に AGs の抗菌活性の特徴は非常に急速な殺菌力を有しかつ濃度が上昇すると急激に殺菌力が増加するという用量依存性の効果にある<sup>103</sup> ので、細菌性眼内炎の治療に AGs を選択するには網膜毒性を生じないかぎりの最高濃度まで眼内の AGs 濃度を高めるのが理論的には有効である。ゆえに細菌性眼内炎の治療に際して硝子体切除術を併用する際には、AGs の全身投与のみでは十分な眼内有効濃度が得られない<sup>104</sup> ので、術中あるいは術直後に抗生剤 (AGs) の硝子体内投与を行い硝子体内薬剤濃度を高める必要があると考えられる。

一方、実際の臨床現場では例えば細菌性眼内炎の原因菌に対して必要十分な抗生剤を全身あるいは局所に使用してもその投与は間欠的であり、また上記報告<sup>101</sup> より硝子体切除された眼においても抗生剤の全身投与では硝子体内抗生剤濃度は十分な有効濃度が達しないと考えられるので、眼内各組織内抗生剤濃度は MIC 以下で推移する時間の方が長い可能性がある。眼内各組織内濃度が MIC 以下であった際、種々の抗生剤がどのような抗菌力を発揮するかなどの報告は調べたかぎりない。しかしながら MIC 以下で抗生剤は全く無力ではなく、その MIC 以下のある濃度範囲で抗生剤が細菌に対して何らかの影響をおよぼしているのではないかという考えすなわち sub-MIC という概念が最近報告されている<sup>105</sup>。ゆえに sub-MIC の臨床的意義は未だ明確にはされていないが、将来的に硝子体内投与された抗生剤による眼内毒性を評価する際には一般の MIC のみならず sub-MIC をも念頭におき、各抗生剤の眼内動態を明らかにし眼内炎の原因菌に対して抗菌力を発揮する硝子体内注入量あるいは眼内灌流液添加濃度を検討すべきであろう。

さて一般に閉鎖腔に対する外科的治療法の原則は切開排膿である<sup>106</sup>。無血管組織でありかつ液性免疫から隔絶された硝子体は細菌が一旦侵入すると格好の培地となり膿瘍が形成されやすい<sup>91</sup>。また眼内炎により眼内に浸潤した白血球は蛋白溶解酵素を放出し網膜に障害を与えるので、早期にこの白血球を除去する必要があるという<sup>106</sup>。さらに AGs は崩壊した好中球や組織の細胞から放出される核分解物と結合して不活化されやすく、膿瘍内の酸性環境 (pH 5.5~6.0) では AGs の活性が正常な pH 7.4 の場合と比べて1/30から1/100に低下するという<sup>107</sup>。ゆえに硝子体切除術によって硝子体膿瘍あるいは混濁を除去し、いわゆる硝子体を人工眼内灌流液に置き換えることは AGs を細菌性眼内炎の治療薬として使用する際の適確な治療法であるといえる。そのような硝子体切除術の効果として他に硝子体内の細菌を除去、細菌が産生する毒素 (エンドトキシン) の排除、眼内への抗生剤の移行・拡散の促進の期待、硝子体の増殖性変化の防止なども挙げられる<sup>108,109</sup>。さらに硝子体切除術の開始時に前房水あるいは硝子体を採取して原因菌の検出同定を行うという診断的役割も期待される<sup>108,109</sup>。ところで

Cottingham ら<sup>17)</sup>は有色ウサギにて *Staphylococcus epidermidis* あるいは *Staphylococcus aureus* を用い実験的細菌性眼内炎を惹起させ、GM 100 $\mu$ g 硝子体内注入のみ、硝子体切除術と GM 100 $\mu$ g 硝子体内注入の併用、硝子体切除術のみの各治療法を受けた群および無治療群における眼内炎の推移を比較検討した。その結果、硝子体切除術と GM 100 $\mu$ g 硝子体内注入の併用の群において眼内炎の治癒傾向が最も顕著であったと報告した。Talley ら<sup>18)</sup>は水晶体囊外摘出後に *Staphylococcus aureus* を硝子体内に接種し実験的細菌性眼内炎を惹起させた有色ウサギ眼において抗生剤の硝子体内注入 (GM 100 $\mu$ g および CEZ 2.25mg) のみ、硝子体切除術のみおよび硝子体切除術と抗生剤の硝子体内注入を併用した治療法を行い、硝子体内の培養陽性率ならびに検眼鏡的にその効果を比較検討した。その結果、治療開始後14日目において硝子体切除術および抗生剤の硝子体内注入の併用療法では9眼中9眼で培養陰性、9眼中7眼で眼底の透見度が回復しており、硝子体内注入のみ (9眼中7眼が陰性、眼底の透見度は9眼中1眼も回復せず) ならびに硝子体切除術のみ (2眼中2眼が培養陽性) に比べ明らかに治療効果が優れることが指摘された。しかしながらヒト細菌性眼内炎の治療法として硝子体切除術の是非には未だ異論が多い。Ficker ら<sup>19)</sup>は早期で軽症の眼内炎では抗生剤の硝子体内注入単独、中等度あるいは重症眼内炎では硝子体切除術、眼内抗生剤投与および全身的ステロイド投与が望ましいと報告している。O'Day ら<sup>20)</sup>は比較的毒性の低い *Staphylococcus epidermidis* のような菌による眼内炎に対しては保存療法 (硝子体切除術あるいは抗生剤の眼内投与を行わず、抗生剤の全身投与なし眼外局所投与) のみで視力予後が良好であったと報告している。しかし全ての眼内炎の原因菌が *Staphylococcus epidermidis* ではなく、他の毒性の高い菌が原因の時には視力予後は悪くなる可能性があるため、Cottingham ら<sup>17)</sup>の報告から推して例えば弱毒菌の可能性があっても保存療法で症状の軽減がみられない時には硝子体切除術を施行すべきであると思われる。以上を鑑み Olk ら<sup>21)</sup>の 1) 視力の著明な低下、2) 保存療法に抵抗性、3) 眼底透見不能、4) 外傷性、5) 毒素性または真菌性などの場合に硝子体手術を行うべきであるという硝子体切除術の適応基準は細菌性眼内炎の治療に際しひとつの参考となろう。従って細菌性眼内炎の病態にはよるが硝子体切除術によって感染巣の除去を併用した抗生剤の眼内投与は眼内炎の治療に非常に有効であると考えられる。そこで硝子体切除眼へ手術終了時に抗生剤を硝子体内注入した際あるいは硝子体切除術中の灌流液へ抗生剤を添加した際のその抗生剤の網膜におよぼす影響を検討することが急務となる。

一般に硝子体切除術によって生じる変化としては組織学的には網膜外層の変化が主体とされ<sup>13)</sup>、網膜細胞活動に必要なイオン勾配が灌流液によって障害され、電気生理学的には ERG 各波の振幅が低下するという<sup>50)114)</sup>。しかしこれらの変化は可逆的で、術後数週以内でほぼ術前の状態に回復したという<sup>50)13)114)</sup>。このように硝子体手術において灌流液自体の影響<sup>13)</sup>、機械的刺激<sup>15)</sup>、手術時の照明<sup>116)</sup> および眼内圧の変動<sup>117)</sup> などによって網膜、硝子体環境は変化し眼組織に種々の影響を与え得る。眼内灌流液としては眼内液に近い組成で角膜や網膜などの眼組織ならびに眼血液関門に対する障害が少ないことが要求される。眼内灌流液としては、硝子体手術が行われ始めた初期では生理食塩水、乳酸リンゲル液などが使用され、現在臨床では BSS<sup>®</sup>、

オペガード<sup>®</sup> MA などが用いられている。本研究では眼組織に与える障害が少なく、他の眼内灌流液に比較して組成において前房水に近くかつ細胞の機能維持に重要な役割を演じているグルタチオンを含む BSS plus<sup>®50)</sup>を使用した。ウサギにおいて硝子体切除術を行う際、ウサギではヒトと異なり眼球全体に対して水晶体が占める体積の割合が大きくなり水晶体が硝子体内に突出しているため、硝子体を十分に切除することは不可能である。そこで硝子体切除術に先立ちまず経結膜的に角膜輪部より6mm 後方に冷凍凝固を行い網膜が癒着化した後に同部位より硝子体切除器具を硝子体内に挿入し硝子体切除術を行う Abrams らの方法<sup>118)</sup>やさらに硝子体を完全に除去するため水晶体切除をまず行い、ついで硝子体切除術を行う方法<sup>119)120)</sup>などが報告されている。しかし Abrams ら<sup>118)</sup>の方法は臨床上的での手術方法と異なり特に冷凍凝固による網膜侵襲<sup>121)122)</sup>は否定出来ない。一方、水晶体を除去する方法では血液房水関門および血液網膜関門が硝子体切除術単独に比べより破壊され<sup>123)</sup>、硝子体腔における薬剤の流入および流出の不均衡<sup>124)</sup>が生じていることが十分予測されるので、薬剤の網膜毒性を評価するにあたってその不均衡の存在<sup>124)</sup>を常に念頭に置かなければならない。硝子体切除術の際に予め少量のフルオレセインを硝子体内に注入して硝子体を黄染させそれを目安に切除術を行う報告<sup>118)</sup>があるがフルオレセインによる ERG 特に b 波への影響を指摘した報告<sup>125)</sup>もあるので、本研究の如く ERG を指標とする実験にはフルオレセインの使用は不適であろう。ゆえに本研究では基本的には水晶体を切除せずに硝子体切除術を行ったが、GM 50 $\mu$ g/ml 灌流を行った白色ウサギ4匹では水晶体切除術も併用し硝子体切除術を行った。本研究において硝子体切除術のみを行う際には水晶体への障害を避けるため、少量の空気を硝子体内に注入し水晶体の後面位置を確認する目安とした。また硝子体なるべく多く切除するために周辺部強膜を押しながら切除を行った。しかしながら硝子体を完全に切除することは出来ず、硝子体切除術のみを行った実験では眼内灌流液に添加された GM が残留硝子体により網膜に直接接し得ず網膜への GM の影響が少なくなっている可能性がある。硝子体切除術中には眼内圧を保持するように努めたが、上記圧迫の際には多少の眼球の変形あるいは網膜の變形がみられた。照明光の網膜への影響を完全に防ぐことは不可能である。本研究では臨床上使用されるライトガイドを用い顕微鏡の同軸照明を用い、照明時間も20分程度であったので、照明による網膜の障害はあっても少なかつたものと推定される。灌流液の温度変化が網膜機能におよぼす影響も問題である。Honda<sup>126)</sup>は白色ウサギ遊離網膜を用い ERG 記録時の灌流液の温度を変化させたところ、30℃以下および40℃以上で ERG b 波の振幅および頂点潜時に著明な変化がみられたという。Rinkoff ら<sup>127)</sup>は有色ウサギにおいて灌流液 (乳酸リンゲル液) の温度を39℃あるいは22℃に設定し照明光の網膜におよぼす影響を検眼鏡のおよび組織学的 (光頭および電頭) に検討したところ、灌流液温度39℃では網膜および RPE に障害がみられたが22℃の灌流液では網膜障害が認められなかったと報告した。また生体では網脈絡膜循環が存在し、外部の温度が網膜へおよぼす影響は補償されるので、硝子体手術における灌流液の温度には網膜ではかなりの許容範囲が容認されるという<sup>50)</sup>。ゆえに眼内灌流液至適温度は未だ定まっていないが、Rinkoff ら<sup>127)</sup>の報告および Moorhead ら<sup>50)</sup>実験条件から推して本研究では灌流液温度として室温 (20~24℃) を使用し

た。

本研究では GM 20 $\mu$ g/ml 灌流は術後4週まで a 波, b 波, c 波および OP に変化を与えず, GM 50 $\mu$ g/ml 灌流は軽度の ERG 変化を来した。また組織学的検索において GM 20 $\mu$ g/ml 灌流眼では対照眼に比べ著明な異常所見はみられなかった。前述の如く細菌性眼内炎の主要な原因菌として *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* などがあり<sup>18)~20)78)~80)</sup>, GM の MIC は *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* に対してそれぞれ 0.2,  $\leq$ 0.1, 0.39, 1.56 $\mu$ g/ml である<sup>81)</sup>。ERG および組織学的に異常がみられない灌流液内 GM 濃度 20 $\mu$ g/ml (図53) と上述の MIC との比は *Staphylococcus aureus* では 100, *Staphylococcus epidermidis* では  $\geq$ 200, *Klebsiella pneumoniae* では 51 および *Pseudomonas aeruginosa* では 13 に達する。しかしながら硝子体内注入の結果と同様でウサギの実験結果をそのままヒトに使用することには慎重を要する。また眼内灌流液への抗生剤の添加は硝子体内注入に比べ抗生剤が直接的に網膜に接するので、網膜毒性がより顕著になる危険性がある。眼内灌流液中の GM の網膜およびその他の眼組織に影響をおよぼさない安全な濃度に関する報告は実験的には Peyman ら<sup>82)</sup>によるものがある。彼ら<sup>82)</sup>は白色ウサギにおいて水晶体を全摘出した翌日に硝子体切除術を GM 添加生理食塩水で30分間行い、術後4週間に組織学的に検討した結果、GM が網膜毒性を来さない至適濃度は 8 $\mu$ g/ml であるとした。彼ら<sup>82)</sup>の実験では GM 25 $\mu$ g/ml 以上の濃度になると組織学的に網膜の障害がみられたという。彼ら<sup>82)</sup>が組織学的に網膜障害を認めた GM 濃度 (25 $\mu$ g/ml) は本研究における GM が ERG および組織学的に変化させない濃度 (20 $\mu$ g/ml) に近似し、両者間に矛盾があるようにみえる。しかし Peyman ら<sup>82)</sup>が用いた灌流液は眼内灌流には不適切であることが実証された<sup>83)84)</sup>。生理食塩水であり、本研究では眼内灌流液として網膜機能維持上優れた BSS plus<sup>®85)</sup>を用いていること、GM 灌流時間が本研究では10分間であったことまた本研究では水晶体を除去していなかったことなどが両者の有毒濃度に関する結論の不一致の原因かもしれない。臨床例として Rowsey ら<sup>20)</sup>は術後眼内炎の治療に際し GM 10 $\mu$ g/ml を含む灌流液にて硝子体切除術を行い良好な結果を得たと報告した。井上ら<sup>21)</sup>は術後眼内炎に対する経扁平部硝子体切除術時の灌流液 (BSS plus<sup>®85)</sup>) 中に GM 20 $\mu$ g/ml および CER 50 $\mu$ g/ml を用い、十分な視力を得たと報告した。また花房ら<sup>22)</sup>は同様に術後眼内炎に対して開放式硝子体切除術を施行し GM 80 $\mu$ g/ml およびセファロチン 400 $\mu$ g/ml を含む灌流液 (BSS<sup>®86)</sup>) にて置換し、良好な視力が得られたと報告した。新里ら<sup>106)</sup>は穿孔性眼外傷による眼内炎5例5眼の硝子体手術の際灌流液に GM 20 $\mu$ g/ml を含有するオベガード<sup>®87)</sup> MA を用い、5眼中3眼で術後視力1.0以上が得られたという。以上の臨床使用報告例<sup>20)~22)</sup>において眼内灌流液に添加した GM の濃度は区々であったが、いずれもある程度の良好な臨床結果を得ている。しかし本研究の結果を考慮すると、抗生剤の眼内灌流時間あるいは総硝子体手術時間などの問題はあがるが、GM 20 $\mu$ g/ml が GM 自体による網膜毒性を誘起せずに治療に奏効する濃度と思われる。

秦野<sup>105)</sup>は細菌性眼内炎を治療するにあたって注意すべき事項を3つあげている。すなわち1. 細菌の感染経路が外因性か内

因性か、2. 感染部位が房水感染であるか硝子体感染であるか、3. 原因菌がグラム陽性菌あるいはグラム陰性菌であるかである。これらにより細菌性眼内炎の予後と対応が異なるという。また眼内炎の細菌学的診断には前房内あるいは硝子体内からの検体採取は必ず必要であり、超音波を利用した画像診断による硝子体変化の観察は細菌学的診断のための硝子体吸引の指標および治療法の選択の参考になる<sup>128)129)</sup>。ERG 検査は前述の如く視力予後の判定に役立つという<sup>18)20)91)</sup>。臨床的には眼内炎では原因菌の同定およびその薬剤感受性の判明前に、抗生剤の抗菌スペクトルを熟知しかつ細菌性眼内炎において頻度の高い原因菌を想定した広域スペクトルを有する抗生剤が十分に投与されるべきである。その際に抗菌スペクトルの拡大および抗菌力の増大を目的に複数の抗生剤を併用することが望ましいとされている。投与方法の基本は抗生剤の大量全身投与および頻回点眼・結膜下注射などであり、前述の如く眼内炎の状態に応じて抗生剤の硝子体内注入法または硝子体手術の際に抗生剤を眼内灌流液中に添加あるいは術後に硝子体内注入をする方法が選択される。ところで特に第3世代セフェムの乱用に起因する感染症原因菌の変貌は眼科領域までおよび、眼内レンズ移植術後に生じたメチシリン耐性表皮ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*) による眼内炎の報告<sup>130)</sup>がみられる。また近年の眼内レンズ移植術の普及によって *Propionibacterium acnes* などの嫌気性菌による眼感染症が注目されるに至った<sup>131)</sup>。一方では AGs の菌体内取込には酸化的磷酸化のエネルギーが用いられるため嫌気的環境のもとではこの機構が働かないので、前述の嫌気性菌による感染症に対して AGs は効力を持たないという<sup>107)</sup>。そこで現在欧米ではそのような点を考慮し、細菌性眼内炎の治療に際し硝子体切除術の有無にかかわらず AGs (GM 100 $\mu$ g あるいは硫酸アミカシン 400 $\mu$ g) および VCM 1mg が選択され眼内投与されている<sup>132)</sup>。一方、全身投与のみで眼内移行が良好であるという薬剤が二三報告されている。Sharir ら<sup>133)</sup>は硝子体切除患者の術前一定時間に第3世代セフェム系抗生剤であるセフトリアキソンナトリウム (ceftriaxone sodium, CTRX) 2g 筋肉内注射を行い、術中に硝子体液および血清を採取し CTRX 濃度を測定した。その結果、投与後4.5時間で硝子体内濃度は平均5.9 $\mu$ g/ml であり、眼内炎治療の有効濃度に達していたという。Wong ら<sup>134)</sup>は有色ウサギを用いリファンピシン (rifampicin, RFP) 経口投与後の RFP 眼内動態を検討し、RFP 150mg 投与4時間後で前房水および硝子体内濃度は最高値に達しそれぞれ4.2および2.2 $\mu$ g/ml であり、その濃度は細菌性眼内炎の主な原因菌の MIC を十分に凌駕していたと報告した。ゆえに上記2薬剤<sup>133)134)</sup>はこれからの細菌性眼内炎の治療法を検討するにあたり非常に有用な薬剤といえる。そこで Flynn ら<sup>135)</sup>はその良好な眼内移行を鑑み重症細菌性眼内炎の治療目的で抗生剤の全身投与を行う際には CTRX 1g/12hr および GM 1g/8hr の使用を推奨している。さて前述したように免疫学的感染防御機能が房水に比し劣る硝子体感染では細菌感染が一旦生じると、失明に至る危険性が非常に高い<sup>91)</sup>。一方では無秩序な抗生剤眼内投与は眼内各組織に悪影響をおよぼす。従って抗生剤の硝子体内注入あるいは硝子体切除術の時期が問題となる。一般には眼底が透見可能な時期には、局所および全身的に強力な抗生剤療法を行い、注意深く経過を観察する。その場合によっては抗生剤の許容硝子体内注入量 (本研究における GM では 100 $\mu$ g) を硝子体内に直接投与する。この

ような治療に反応を示さず症状が悪化して眼底の透見度が悪くなれば期を失せず硝子体切除術に踏み切るべきであろう。また Cottingham ら<sup>17)</sup>は有色ウサギに実験的に *Staphylococcus aureus* による眼内炎を惹起させ GM 100 $\mu$ g を硝子体内に1回注入しその治療効果を検討したところ、菌の接種後24時間以内に硝子体内注入が行われた場合には有効であるが、接種後48時間後では1回の硝子体内注入では治療出来なかったという。Davey ら<sup>18)</sup>は進行する眼内炎では眼内を無菌化するためには眼内抗生剤濃度を有効濃度で持続させることが重要であると考え、ウサギにおいて実験的に *Pseudomonas aeruginosa* による眼内炎を惹起させ菌接種48時間後から毎日5回連続に GM 1,000 $\mu$ g を硝子体内注入し検討した。その結果、眼内炎惹起7日目においても眼内は無菌化されなかったという。深作ら<sup>19)</sup>は全眼球炎の3症例を呈示し、外傷性も含む眼内炎の治療として硝子体切除術と抗生剤投与の併用療法を発症後3日以内に行うべきであると報告した。Laatikainen ら<sup>18)</sup>は12例の術後眼内炎に硝子体手術を行い、そのうち10眼が0.1以上の視力を得たとし、発症24時間以内に硝子体切除術を施行した5例全例で0.1~0.6の視力を得たのに対し、30~48時間以上経過して手術した7眼ではそのうち2眼が失明し、早期硝子体手術の優位性を報告した。以上より一般に細菌性眼内炎が一旦発症すればその進行は急速であり眼内各組織は破壊され予後は不良であるので、眼内炎に対する早期診断および早期治療法の選択ならびに開始が必須である。

## 結 論

硫酸ゲンタマイシン (GM) の硝子体内注入が網膜におよぼす急性あるいは慢性的影響を、ウサギの正常眼あるいは硝子体切除眼において、ERG の a 波、b 波、OP および一部の実験では c 波、VEP ならびに組織学検査法を指標として検討し、下記の結果を得た。また GM 硝子体内1回注入後の眼内 GM 動態、GM 2回注入による網膜毒性ならびに眼内灌流液中への GM 添加が網膜におよぼす影響、あるいは硝子体切除眼や水晶体および硝子体切除眼に GM の全身投与を行い、GM の前房水ならびに硝子体内への移行についても検討し、以下の結果を得た。

1. 正常眼への GM 80 $\mu$ g 硝子体内1回注入では急性のおよび慢性的観察においても a 波、b 波、c 波および OP ならびに VEP の早期成分はほとんど変化しなかった。また組織学的にも網膜には対照眼に比し異常所見はみられなかった。硝子体切除眼への同量の GM 硝子体内注入においても同様の結果であった。

2. 正常眼への GM 160 $\mu$ g 硝子体内1回注入では調べた5匹中2匹で注入後2週目に ERG が消失した。GM 200 $\mu$ g 1回注入では注入後1週で b 波および OP は軽度に減弱し、角膜側陰性の緩徐な波形がみられた。GM 160 および 200 $\mu$ g 硝子体内注入による ERG 変化の中には慢性的観察において回復傾向を示すものがあつた。

3. 正常眼への GM 240 $\mu$ g 硝子体内1回注入では注入後早期(2~3時間)に b 波振幅は減少したが、VEP の早期成分は有意には変化しなかった。慢性的観察では硝子体内注入後2週目までに ERG は消失し、ERG 変化は不可逆的であつた。

4. GM 400 $\mu$ g 硝子体内1回注入の急性の観察では b 波振幅は著明に減少したが、c 波振幅には増大あるいは減少と一定傾

向はみられなかった。VEP の早期成分は GM 注入眼において対照眼に比し若干の延長傾向を示したが有意差はなかった。

5. 白色ウサギ正常眼への GM 80 $\mu$ g 硝子体内1回注入後の硝子体内 GM 濃度の半減期は約31時間であつた。

6. GM 80 $\mu$ g 反復硝子体内注入では2回目注入後3時間ないし2週目に b 波あるいは OP の軽度の減弱がみられ、また調べた3匹中1匹において注入後1週目の眼底検査にて小白斑がみられたので临床上では反復 GM 注入は出来るかぎり避けるべきであり、例え再注入を行うにしても再注入後の眼底変化などに十分に注意をすべきであると思われた。

7. GM 20 $\mu$ g/ml 眼内灌流では硝子体切除術後4週まで a 波、b 波、c 波および OP には対照眼と比べほとんど変化はみられなかった。組織学的にも異常はみられなかった。GM 50 $\mu$ g/ml 眼内灌流では硝子体切除後1~2週で軽度の b 波および OP の減弱がみられたが、組織学的には明らかな変化はみられなかった。

8. GM 5mg/kg 全身投与後における硝子体切除眼の硝子体内 GM 濃度は測定限界値以下であつた。水晶体および硝子体切除眼では術後翌日を除いて術後4週まで硝子体内に GM の移行が認められた。

9. 電気生理学および組織学的検査法を指標にすると、ヒト細菌性眼内炎の治療目的に用いるべき硝子体内注入量として、網膜毒性の観点から、GM 100 $\mu$ g を推奨する。また硝子体切除術の際に眼内灌流液に添加する GM 濃度として同様の観点から 20 $\mu$ g/ml を越えるべきではない。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚の謝意を捧げます。また本研究にご協力下さいました当教室島崎真人学士、山下陽子学士、小松雅樹学士、棚橋俊郎学士に感謝致します。本学工作係水野清澄技官の実験器具・装置の作製についての協力を感謝致します。

## 文 献

- 1) Rubinstein, E., Goldfarb, J., Keren, G., Blumenthal, M. & Treister, G.: The penetration of gentamicin into the vitreous humor in man. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 24, 637-639 (1983).
- 2) Furgiuele, F. P.: Ocular penetration and tolerance of gentamicin. *Am. J. Ophthalmol.*, 64, 421-426 (1967).
- 3) Barza, M., Kane, A. & Baum, J.: Intraocular penetration of gentamicin after subconjunctival and retrobulbar injection. *Am. J. Ophthalmol.*, 85, 541-547 (1978).
- 4) Bennett, T. O. & Peyman, G. A.: Toxicity of intravitreal aminoglycosides in primates. *Can. J. Ophthalmol.*, 9, 475-478 (1974).
- 5) Peyman, G. A., May, D. R., Ericson, E. S. & Apple, D.: Intraocular injection of gentamicin, toxic effects and clearance. *Arch. Ophthalmol.*, 92, 42-47 (1974).
- 6) Peyman, G. A., Paque, J. T., Meisels, H. I. & Bennett, T. O.: Postoperative endophthalmitis: A comparison of methods for treatment and prophylaxis with gentamicin. *Ophthalmic Surg.*, 6, 45-55 (1975).
- 7) Ling, C. H., Peyman, G. H. & Raichand, M.: Electron microscopic study of toxicity of intravitreal injections

- of gentamicin in primates. *Can. J. Ophthalmol.*, **20**, 179-183 (1985).
- 8) Morgan, B. S., Larson, B., Peyman, G. A. & West, C. S.: Toxicity of antibiotic combinations for vitrectomy infusion fluid. *Ophthalmic Surg.*, **10**, 74-77 (1979).
- 9) Zachary, I. G. & Forster, R. K.: Experimental intravitreal gentamicin. *Am. J. Ophthalmol.*, **82**, 604-611 (1976).
- 10) Palimeris, G., Moschos, M., Theodossiadis, G. & Velissaropoulos, P.: Intravitreale Injektion von Gentamicin-eigene Versuchsergebnisse. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, **175**, 216-219 (1979).
- 11) D'Amico, D. J., Libert, J., Kenyon, K. R., Hanninen, L. A. & Caspers-Velu, L.: Retinal toxicity of intravitreal gentamicin: An electron microscopic study. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **25**, 564-572 (1984).
- 12) D'Amico, D. J., Caspers-Velu, L., Libert, J., Shanks, E. T., Schrooyen, M., Hanninen, L. A. & Kenyon, K. R.: Comparative toxicity of intravitreal aminoglycoside antibiotics. *Am. J. Ophthalmol.*, **100**, 264-275 (1985).
- 13) Talamo, J. H., D'Amico, D. J., Hanninen, L. A., Kenyon, K. R. & Shanks, E. T.: The influence of aphakia and vitrectomy on experimental retinal toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Am. J. Ophthalmol.*, **100**, 840-847 (1985).
- 14) Tabatabay, C. A., D'Amico, D. J., Hanninen, L. A. & Kenyon, K. R.: Experimental drusen formation induced by intravitreal aminoglycoside injection. *Arch. Ophthalmol.*, **105**, 826-830 (1987).
- 15) Peyman, G. A., Vastine, D. W., Crouch, E. R. & Herbst, R. W. Jr.: Clinical use of intravitreal antibiotics to treat bacterial endophthalmitis. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolarygol.*, **78**, 862-875 (1974).
- 16) Peyman, G. A. & Herbst, R.: Bacterial endophthalmitis: treatment with intraocular injection of gentamicin and dexamethasone. *Arch. Ophthalmol.*, **91**, 416-418 (1974).
- 17) Cottingham Jr, A. J. & Forster, R. K.: Vitrectomy in endophthalmitis: Results of study using vitrectomy, intraocular antibiotics, or a combination of both. *Arch. Ophthalmol.*, **94**, 2078-2081 (1976).
- 18) Forster, R. K., Abbott, R. L. & Gelender, H.: Management of infectious endophthalmitis. *Ophthalmology*, **87**, 313-319 (1980).
- 19) Puliafito, C. A., Baker, A., Haaf, J. & Forster, C. S.: Infectious endophthalmitis: Review of 36 cases. *Ophthalmology*, **89**, 921-929 (1982).
- 20) Rowsey, J. J., Newsom, D. L., Sexton, D. J. & Harms, W. K.: Endophthalmitis. Current approaches. *Ophthalmology*, **89**, 1055-1066 (1982).
- 21) 井上幸次, 松本聖子, 斎藤喜博, 西川憲清, 田野保雄, 真鍋禮三: 術後眼内炎に対する硝子体切除術. *眼紀*, **34**, 536-542 (1983).
- 22) 花房 晶, 白井正彦, 宮沢文明, 村松隆次, 岩下正美, 鈴木弘隆: 術後眼内炎に対する Open-sky vitrectomy と抗生物質溶液による硝子体置換. *あたらしい眼科*, **1**, 717-722 (1984).
- 23) Snider, J. D., Cohen, H. B. & Chenoweth, R. G.: Acute ischemic retinopathy secondary to intraocular injection of gentamicin. *In* S. J. Ryan, A. K. Dawson & H. L. Little (eds.), *Retinal Diseases*, 1st ed., p227-232, Grune & Stratton, Orlando, Florida, 1985.
- 24) Conway, B. P. & Campochiaro, P. A.: Macular infarction after endophthalmitis treated with vitrectomy and intravitreal injection. *Arch. Ophthalmol.*, **104**, 367-371 (1986).
- 25) McDonald, H. R., Schatz, H., Allen, A. W., Chenoweth, R. G., Cohen, H. B., Crawford, J. B., Klein, R., May, D. R. & Snider III, J. D.: Retinal toxicity secondary to intraocular gentamicin injection. *Ophthalmology*, **93**, 871-877 (1986).
- 26) 大野木淳二: In vitro ERG に対する抗生剤の影響. III. 家兎眼におけるアミノグリコンド系抗生剤の検討. *十全医会誌*, **95**, 491-504 (1986).
- 27) 鳥崎真人, 望月清文, 山下陽子, 小松雅樹, 棚橋俊郎, 河崎一夫, 大平光彦: ロメフロキサシン硝子体内注入後の眼内動態. *あたらしい眼科*, **8**, 937-940 (1991).
- 28) 米村大蔵, 河崎一夫: 律動様小波とその臨床. *眼科 MOOK No.14. 眼と電気生理* (田沢豊編), 第1版, 59-70頁, 金原出版, 東京, 1980.
- 29) 井上治郎, Potts, A. M.: 家兎の EER (Electrically evoked response of the visual system) について. *日眼会誌*, **75**, 765-772 (1971).
- 30) 谷口守男: 視覚誘発反応 (VER) に関する研究. 第1報. 家兎 VER の潜時について. *眼紀*, **17**, 221-228 (1966).
- 31) Thompson, J. M., Woolsey, C. N. & Talbot, S. A.: Visual areas I and II of cerebral cortex of rabbit. *J. Neurophysiol.*, **13**, 278-288 (1950).
- 32) 米村大蔵, 河崎一夫, 石川千秋: 高浸透性溶液点滴時にみられた ERG 変化. *日眼会誌*, **80**, 610-616 (1976).
- 33) 米村大蔵, 土田 豊, 藤村和昌, 山田芳明: 家兎視神経及び視覚領における新誘発電位成分について. *日眼会誌*, **71**, 230-234 (1967).
- 34) 米村大蔵, 土田 豊, 山田芳明, 藤村和昌: 家兎 VEP における初期陽性電位について. *日眼会誌*, **71**, 449-453 (1967).
- 35) Hughes, A. & Wilson, M. E.: Callosal terminations along the boundary between visual areas I and II in the rabbit. *Brain Res.*, **12**, 19-25 (1969).
- 36) Peyman, G. A., Spitznas, M. & Straatsma, B. R.: Peroxidase diffusion in the normal and photocoagulated retina. *Invest. Ophthalmol.*, **10**, 181-189 (1971).
- 37) Sasovetz, D.: Ketamine hydrochloride: An effective general anesthetic for use in electroretinography. *Ann. Ophthalmol.*, **9**, 1510-1514 (1978).
- 38) 河崎一夫, 四日剛太郎, 米村大蔵: カイウサギ ERG の off 応答に重畳する律動様小波. *眼紀*, **24**, 587-591 (1973).
- 39) 升田義次: ウサギ ERG に対する全身麻酔薬の影響について. *日眼会誌*, **67**, 245-251 (1963).
- 40) 渡辺郁緒, 外山喜一: 麻酔薬の ERG におよぼす影響. *眼紀*, **29**, 743-746 (1978).
- 41) Nao-i, N., Kim, S. Y. & Honda, Y.: The normal c-wave amplitude in rabbits. *Doc. Ophthalmol.*, **63**, 121-130



- (1986).
- 42) Spivey, B. E. & Pearlman, J. T.: Day-to-day variations in the ERG of humans and rabbits. *Am. J. Ophthalmol.*, **55**, 1013-1020 (1963).
- 43) Lawwill, T.: Practical rabbit electroretinography. *Am. J. Ophthalmol.*, **74**, 135-141 (1972).
- 44) 稲富 誠, 杉町剛美, 中島 章: 麻酔薬のラット ERG におよぼす影響. *眼紀*, **29**, 737-742 (1978).
- 45) 張 明哲, 高瀬正彌: 電気生理学的網膜毒性評価法に関する研究. —ヨウ素酸ナトリウム, 硝子体注入の影響—. *日眼会誌*, **88**, 1350-1356 (1984).
- 46) Royster, A. J., Nanda, S. K., Hatchell, D. L., Tiedeman, J. S., Dutton, J. J. & Hatchell, M. C.: Photochemical initiation of thrombosis. Fluorescein angiographic, histologic, and ultrastructural alterations in the choroid, retinal pigment epithelium, and retina. *Arch. Ophthalmol.*, **106**, 1608-1614 (1988).
- 47) 西川 隆, 久保博昭, 竹内尚子, 村瀬勢津子: EMIT gentamicin assay および EMIT tobramycin assay (血中ゲンタマイシンおよびトブラマイシンのエンザイムイムノアッセイ) の検討. *機器・試薬*, **5**, 145-149 (1982).
- 48) Kane, A., Barza, M. & Baum, J.: Intravitreal injection of gentamicin in rabbits: Effect of inflammation and pigmentation on half-life and ocular distribution. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **20**, 593-597 (1981).
- 49) Maurice, D. M.: Injection of drugs into the vitreous body. *In* I. H. Leopold & R. P. Burns (eds.), *Symposium on Ocular Therapy*, vol 9, 1st ed., p59-72, John Wiley & Sons, New York, 1976.
- 50) Cobo, L. K. & Forster, R. K.: The clearance of intravitreal gentamicin. *Am. J. Ophthalmol.*, **92**, 59-62 (1981).
- 51) Barza, M., Kane, A. & Baum, J.: Pharmacokinetics of intravitreal carbenicillin, cefazolin, and gentamicin in rhesus monkeys. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **24**, 1602-1606 (1983).
- 52) Ben-Nun, J., Joyce, D. A., Cooper, R. L., Cringle, S. J. & Constable, I. J.: Pharmacokinetics of intravitreal injection: Assessment of a gentamicin model by ocular dialysis. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **30**, 1055-1061 (1989).
- 53) 西 興史: 動物実験における確実な麻酔法. *日本の眼科*, **60**, 877-878 (1989).
- 54) 本田孔士: 硝子体置換, 硝子体外科の基礎としての電気生理学的研究の重要性. —硝子体環境変化の網膜機能に及ぼす影響について—. *眼科*, **20**, 541-550 (1978).
- 55) Aaberg, T. M. & Williams, G. A.: Pharmacology of surgery of the vitreous and retina. *In* M. Sears & A. Tarkkanen (eds.), *Surgical Pharmacology of the Eye*, 1st ed., p503-520, Raven Press, New York, 1985.
- 56) Moorhead, L. C., Redburn, D. A., Merritt, J. & Garcia, C. A.: The effects of intravitreal irrigation during vitrectomy on the electroretinogram. *Am. J. Ophthalmol.*, **88**, 239-245 (1979).
- 57) Declercq, S. S., Meredith, P. C. A. & Rosenthal, A. R.: Experimental siderosis in the rabbit. Correlation between electroretinography and histopathology. *Arch. Ophthalmol.*, **95**, 1051-1058 (1977).
- 58) Amemiya, T.: Electron microscopic study of the retina of rats repeatedly treated with urethan. *日眼会誌*, **72**, 293-298 (1968).
- 59) Bellhorn, R. W., Bellhorn, M., Friedman, A. H. & Henkind, P.: Urethan-induced retinopathy in pigmented rats. *Invest. Ophthalmol.*, **12**, 65-76 (1973).
- 60) 日本抗生物質学術協議会: 日本抗生物質医薬品基準解説 1990. 第1版, 45-48 頁, 薬業時報社, 東京, 1990.
- 61) Davson, H. & Luck, C. P.: A comparative study of the total carbon dioxide in the ocular fluids, cerebrospinal fluid, and plasma of some mammalian species. *J. Physiol.*, **132**, 454-464 (1956).
- 62) 川口博治, 米村大蔵, 河崎一夫, 柴田二郎, 白倉弘子, 田辺譲二, 中川寛忠: 家兎眼 in vitro ERG におよぼす浸漬液 pH の影響. *日眼会誌*, **83**, 454-462 (1979).
- 63) 本田孔士: 硝子体外科のバイオロジー. 硝子体の諸問題 (II). *日眼会誌*, **85**, 1910-1949 (1981).
- 64) 柴田二郎: 家兎摘出眼 ERG に対する浸透圧の影響. *日眼会誌*, **78**, 844-857 (1974).
- 65) Allen, H. F. & Mangiaracine, A. B.: Bacterial endophthalmitis after cataract extraction. A study of 22 infections in 20000 operations. *Arch. Ophthalmol.*, **72**, 454-462 (1964).
- 66) 三国政吉, 大石正夫, 高橋篁子: 全眼球炎の化学療法について. *臨眼*, **65**, 1073-1082 (1971).
- 67) 清水喜八郎, 戸塚恭一, 熊田徹平, 片平潤一, 深田智子: 化学療法の今後への展望. *臨床と研究*, **65**, 1-9 (1988).
- 68) 大石正夫: 細菌性眼感染症と化学療法. *眼臨*, **84**, 471-477 (1990).
- 69) Barza, M., Baum, J. & Kane, A.: Inhibition of antibiotic activity in vitro by synthetic melanin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10**, 569-570 (1976).
- 70) Fukuda, M. & Sasaki, K.: Changes in the antibacterial activity of melanin-bound drugs. *Ophthalmic Res.*, **22**, 123-127 (1990).
- 71) Libert, J., Ketelbant-Balasse, P. E., Van Hoof, F., Aubert-Tulkens, G. & Tulkens, P.: Cellular toxicity of gentamicin. *Am. J. Ophthalmol.*, **87**, 405-411 (1979).
- 72) 瀬川雄三, 大久保裕史, 西山敬三: Tobramycin の家兎眼に対する細胞毒性について. 透過並びに走査電顕的研究. *眼臨*, **77**, 1787-1792 (1983).
- 73) Hayasaka, S.: Lysosomes and the eye. *In* J. T. Dingle, R. T. Dean & W. Sly (eds.), *Lysosomes in Biology and Pathology*, 1st ed., p421-441, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.
- 74) Maffei, L. & Fiorentini, A.: Electroretinographic responses to alternating gratings before and after section of the optic nerve. *Science*, **211**, 953-955 (1981).
- 75) Sanders, W. E. Jr. & Sanders, C. C.: Toxicity of antibacterial agents. Mechanism of action on mammalian cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 53-83 (1979).

- 76) Weinstein, L.: Antimicrobial agents. Streptomycin, gentamicin and other aminoglycosides. In L. S. Goodman & A. Gilman (eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 5th ed., p1167-1182, Macmillan Publishing, New York, 1970.
- 77) Echeverria, P., Fina, D., Norton, S. & Smith, A. L.: Ototoxicity of gentamicin. Clinical experience in a children's hospital. *Chemotherapy*, **24**, 267-271 (1978).
- 78) Driebe, W. T. Jr., Mandelbaum, S., Forster, R. K., Schwartz, L. K. & Culbertson, W. W.: Pseudophakic endophthalmitis: Diagnosis and management. *Ophthalmology*, **93**, 442-448 (1986).
- 79) Parrish, C. M. & O'Day, D. M.: Traumatic endophthalmitis. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **27**, 112-119 (1987).
- 80) 秦野 寛, 井上克洋, 的場博子, 栗田正幸: 細菌(真菌)性眼内炎の動向. 発症動機と起炎菌. *臨眼*, **43**, 121-124 (1989).
- 81) 五島瑛智子, 西田 実: 抗菌スペクトルと抗菌力. アミノ配糖体薬(上田泰編), 第1版, 44-58頁, 南江堂, 東京, 1985.
- 82) 米村大蔵, 升田義次, 八田正幸: 哺乳類, 鳥類及び冷血動物における ERG の律動様小波と網膜の組織学的所見について. *日眼会誌*, **67**, 339-344 (1963).
- 83) 米村大蔵, 升田義次: 家兎網膜の Visual Streak と神経節細胞の密度. *日眼会誌*, **74**, 1-5 (1970).
- 84) Wong, I. G.: Experimental bacterial endophthalmitis. In K. F. Tabbara & R. M. Cello (eds.), *Animal Models of Ocular Diseases*, 1st ed., p137-142, Springfield, Illinois, 1982.
- 85) Conway, B. P., Tabatabay, C. A., Compochiaro, P. A., D'Amico, D. J., Hanninen, L. A. & Kenyon K. R.: Gentamicin toxicity in the primate retina. *Arch. Ophthalmol.*, **107**, 107-112 (1989).
- 86) Brown, G. C., Eagle, R. C., Shakin, E. P., Gruber, M. & Arbizio, V. V.: Retinal toxicity of intravitreal gentamicin. *Arch. Ophthalmol.*, **108**, 1740-1744 (1990).
- 87) Jeglum, E. L., Rosenberg, S. B. & Benson, W. E.: Preparation of intravitreal drug doses. *Ophthalmic Surg.*, **12**, 355-359 (1981).
- 88) Caskey, P. J. & Folk, J. C.: Accurate gentamicin solution for intravitreal injection. *Arch. Ophthalmol.*, **105**, 454 (1987).
- 89) Noske, W.: Inaccuracy in preparation of intravitreal solutions. *Arch. Ophthalmol.*, **104**, 1748-1749 (1986).
- 90) Conway, B. P. & Campochiaro, P. A.: In reply. *Arch. Ophthalmol.*, **104**, 1749 (1986).
- 91) 秦野 寛, 佐々木隆敏, 田中直彦: 緑膿菌性眼内炎の実験的研究—硝子体内接種による病像, 眼内生菌数, ERG—. *日眼会誌*, **92**, 1758-1764 (1988).
- 92) 田中信男: 作用機序. アミノ配糖体薬(上田泰編), 第1版, 33-43頁, 南江堂, 東京, 1985.
- 93) Tabatabay, C. A., Young, L. H., D'Amico, D. J. & Kenyon, K. R.: Immunocytochemical localization of gentamicin in the rabbit retina following intravitreal injection. *Arch. Ophthalmol.*, **108**, 723-726 (1990).
- 94) Brazil, O. V. & Prado-Franceschi, J.: The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **179**, 78-85 (1969).
- 95) Kawasaki, K., Yonemura, D., Wajima, R., Torisaki, M., Okamoto, T. & Mochizuki, K.: Effects on electroretinogram of gentamicin in vitrectomy solution and its intravitreal clearance. *Concepts Toxicol.*, **4**, 207-214 (1987).
- 96) Moreira, C. A. Jr., Armstrong, D. K., Jelliffe, R. W., Moreira, A. T., Woodford, C. C., Liggett, P. E. & Trousdale, M. D.: Sodium hyaluronate as a carrier for intravitreal gentamicin: An experimental study. *Acta Ophthalmol.*, **69**, 45-49 (1991).
- 97) Oum, B. S., D'Amico, D. J. & Wong, K. W.: Intravitreal antibiotic therapy with vancomycin and aminoglycoside: An experimental study of combination and repetitive injections. *Arch. Ophthalmol.*, **107**, 1055-1060 (1989).
- 98) Olson, J. C., Flynn, H. W. Jr., Forster, R. K. & Culbertson, W. W.: Results in the treatment of postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology*, **90**, 692-699 (1983).
- 99) Stern, G. A., Engel, H. M. & Driebe, W. T. Jr.: The treatment of postoperative endophthalmitis: Results of differing approaches to treatment. *Ophthalmology*, **96**, 62-67 (1989).
- 100) 西村葉子, 林 英之, 生井昭子, 大平元昭, 大島健司: 硝子体切除眼のフルオロフォトメトリー. *眼紀*, **35**, 1450-1454 (1984).
- 101) 林 英之, 百枝 榮, 京野真三, 清沢崇晃: 筋肉内投与されたゲンタマイシンの硝子体切除眼硝子体腔中への移行に関する実験的研究. *眼紀*, **34**, 2305-2308 (1983).
- 102) 矢田浩二, 樋田哲夫: 術後眼内炎および転移性眼内炎. *眼科 MOOK No.44. 最新の眼科薬物療法(藤原隆明編)*, 第1版, 113-120頁, 金原出版, 東京, 1990.
- 103) 健山正男, 斎藤 厚: アミノ配糖体系抗生物質. *日本臨床*, **48**, 2196-2199 (1990).
- 104) 松本文夫: sub-MIC をとりまく臨床上の諸問題. *臨と微生物*, **12**, 6-12 (1985).
- 105) 秦野 寛: 細菌性眼内炎の診断と治療. *臨眼*, **43**, 1077-1080 (1989).
- 106) 新里悦朗, 三島 弘, 松本長太, 真野真弓, 大里美由紀, 井上淳子, 中尾雄三, 大島利文: 眼内炎に対する硝子体手術時期について. —超音波学的検討—. *眼紀*, **36**, 1903-1907 (1985).
- 107) Neu, H. C.: General concepts on the chemotherapy of infectious diseases. *Med. Clin. North Am.*, **71**, 1051-1064 (1987).
- 108) Ficker, L. A., Meredith, T. A., Wilson, L. A. & Kaplan, H. J.: Role of vitrectomy in *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis. *Br. J. Ophthalmol.*, **72**, 386-389 (1988).
- 109) Verbraeken, H., Geeroms, B. & Karemera, A.: Treatment of endophthalmitis by pars plana vitrectomy. *Ophthalmologica*, **197**, 19-25 (1988).
- 110) Talley, A. R., D'Amico, D. J., Talamo, J. H., Casey, V-N. J. & Kenyon, K. R.: The role of vitrectomy in the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis.

- An experimental study. Arch. Ophthalmol., 105, 1699-1702 (1987).
- 111) O'Day, D. M., Jones, D. B., Patrinely, J. & Elliott, J. H.: *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis: Visual outcome following noninvasive therapy. Ophthalmology, 89, 354-360 (1982).
- 112) Olk, R. & Bohigian, G. M.: The management of endophthalmitis: Diagnostic and therapeutic guidelines including the use of vitrectomy. Ophthalmic Surg., 18, 262-267 (1987).
- 113) 島田宏之: 硝子体手術に関する基礎的研究. その1 家兎眼網膜に及ぼす影響に関する実験的研究. 眼紀, 33, 878-890 (1982).
- 114) 小林樹夫, 魚谷 純, 山名忠巳, 藤井正満, 市頭教治: 硝子体手術の実験的研究 (第1報). 一家兎眼 ERG に及ぼす影響一. 眼紀, 34, 2597-2602 (1983).
- 115) 橋本 恵, 浅山邦夫: 硝子体手術における網膜障害に関する実験的研究. その1 機械的接触. 日眼会誌, 84, 1399-1407 (1980).
- 116) Friedman, E. & Kuwabara, T.: The retinal pigment epithelium. IV. The damaging effects of radiant energy. Arch. Ophthalmol., 80, 265-279 (1968).
- 117) Tso, M. O. M. & Shih, C. Y.: Disruption of blood-retinal barrier in ocular hypotony: Preliminary report. Exp. Eye Res., 23, 209-216 (1976).
- 118) Abrams, G. W., Topping, T. & Machemer, R.: An improved method for practice vitrectomy. Arch. Ophthalmol., 96, 521-525 (1978).
- 119) Kaplan, H. J., Diamond, J. G. & Brown, S. A.: Vitrectomy in experimental uveitis. I. Operative technique in rabbits. Arch. Ophthalmol., 97, 331-335 (1979).
- 120) Machemer, R.: Development of vitreous surgery. In G. W. Blakenship, M. Stirpe, M. Gonvers & S. Binder (eds.), Basic and Advanced Vitreous Surgery, vol 2, 1st ed., p1-5, Liviana Press, Padova, 1986.
- 121) 加藤美代子, 後藤 修, 安藤文隆: 網膜冷凍凝固による血液網膜網傷害の Vitreous Fluorophotometry による研究. 眼紀, 33, 2392-2399 (1982).
- 122) Jaccoma, E. H., Conway, B. P. & Campochiaro, P. A.: Cryotherapy causes extensive breakdown of the blood-retinal barrier. A comparison with argon laser photocoagulation. Arch. Ophthalmol., 103, 1728-1730 (1985).
- 123) Miyake, K.: Blood-retinal barrier in eyes with long-standing aphakia with apparently normal fundi. Arch. Ophthalmol., 100, 1437-1439 (1982).
- 124) 三宅謙作: 硝子体腔からの物質の能動輸送を巡って. 日眼会誌, 92, 909-945 (1988).
- 125) Moorehead, L. C.: Practice vitrectomy. Arch. Ophthalmol., 98, 1297-1298 (1980).
- 126) Honda, Y.: Influences of environmental temperature on the electrical activity of rabbit retinas in vitro. Jpn. J. Ophthalmol., 14, 138-145 (1970).
- 127) Rinkoff, J., Machemer, R., Hida, T. & Chandler, D.: Temperature-dependent light damage to the retina. Am. J. Ophthalmol., 102, 452-462 (1986).
- 128) 林 英之, 中間宣博, 百枝 榮, 生井昭子, 大島健司: 全眼球炎 (眼内炎) の治療における超音波検査の有用性. 眼紀, 32, 2603-2607 (1981).
- 129) 新里悦朗, 松本長太, 橋本陽世, 小島伸介, 三島 弘, 大島利文: 外傷性眼内炎の超音波Bモード所見について. 分類と治療および予後. 臨眼, 40, 343-346 (1986).
- 130) Lambert, S. R. & Stern, W. H.: Methicillin- and gentamicin-resistant *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis after intraocular surgery. Am. J. Ophthalmol., 99, 725-726 (1985).
- 131) Meisler, D. M. & Mandelbaum, S.: Propionibacterium-associated endophthalmitis after extracapsular cataract extraction: Review of reported cases. Ophthalmology, 96, 54-61 (1989).
- 132) Flynn, H. W., Pflugfelder, S. C., Culbertson, W. W. & Davis, J. L.: Recognition, treatment, and prevention of endophthalmitis. Semin. Ophthalmol., 4, 69-83 (1989).
- 133) Sharir, M., Triester, G., Kneer, J. & Rubinstein, E.: The intravitreal penetration of ceftriaxone in man following systemic administration. Invest. Ophthalmol. & Visual Sci., 30, 2179-2183 (1989).
- 134) Wong, K. W., D'Amico, D. J., Oum, B. S., Baker, P. A. & Kenyon, K. R.: Intraocular penetration of rifampin after oral administration. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 228, 40-43 (1990).
- 135) Flynn, H. W., Pulido, J. S., Pflugfelder, S. C., Davis, J. L., Culbertson, W. W., Roussel, T. J. & Miller, D.: Endophthalmitis therapy: Changing antibiotic sensitivity patterns and current therapeutic recommendations. Arch. Ophthalmol., 109, 175-176 (1991).
- 136) Davey, P. G., Barza, M. & Stuart, M.: Dose response of experimental pseudomonas endophthalmitis to ciprofloxacin, gentamicin, and imipenem: Evidence for resistance to "late" treatment of infections. J. Infect. Dis., 155, 518-523 (1987).
- 137) 深作秀春, 谷口重雄, 深道義尚: 全眼球炎に対する早期硝子体手術. 眼科, 29, 931-935 (1987).
- 138) Laatikainen, L. & Tarkkanen, A.: Early vitrectomy in the treatment of postoperative purulent endophthalmitis. Acta Ophthalmol., 65, 455-460 (1987).

**Nontoxic Concentration of Gentamicin Sulfate for Intravitreal Use** Kiyofumi Mochizuki, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **101**, 897—939 (1992)

**Key words** gentamicin, intravitreal injection, electroretinogram, vitrectomy, clearance from vitreous cavity

#### Abstract

An intravitreal injection of antibiotics is an important treatment against bacterial endophthalmitis. However, the nontoxic concentration of antibiotics for intravitreal use has not yet been established. The present study investigated the acute and chronic effects on the retina of intravitreal injection of gentamicin sulfate (GM), one of aminoglycoside antibiotics, in normal and vitrectomized rabbit eyes. The effects on the retina were evaluated by the in-vivo electroretinogram (ERG) (the a-wave, the b-wave, the c-wave and the oscillatory potential), the visually evoked potential (VEP) and histological examinations. The intraocular pharmacokinetics of GM after an intravitreal injection and the effects of repeated intravitreal injections of GM on the retina were also studied to estimate appropriate time interval of GM re-injection. In addition, the vitrectomy was performed using a GM-containing intraocular infusion fluid, and the toxicity of GM in the infusion fluid on the retina was evaluated electrophysiologically and histologically. The concentration of GM was determined in the aqueous humor and the vitreous humor of normal, vitrectomized and aphakic/vitrectomized eyes of albino rabbits 1 hr after intramuscular injection of 5 mg/kg GM. Non-vitrectomized phakic rabbit eyes intravitreally injected with 80  $\mu$ g GM showed no changes in the a-wave, the b-wave, the c-wave, the oscillatory potential, the initial positive responses of the VEP or histological findings. An intravitreal injection of 80  $\mu$ g GM into vitrectomized eyes had no toxic effects on the retina. The half-life of the intravitreal GM concentration after an intravitreal injection of 80  $\mu$ g was about 31 hr in albino rabbits. Repeated injections of 80  $\mu$ g GM at the interval of 72 hr induced slight changes in the ERG, and thus should be clinically avoided. The ERG was eliminated 2 weeks after an intravitreal injection of 160  $\mu$ g GM in 2 out of 5 rabbits. An intravitreal injection of 200  $\mu$ g GM eliminated the c-wave 1 week after the injection, only slightly diminishing the b-wave and the oscillatory potential. An intravitreal injection of 240  $\mu$ g GM irreversibly eliminated all the ERG components examined. The initial positive responses of the VEP did not deteriorate with an intravitreal injection of 400  $\mu$ g GM. Intraocular irrigation with 20  $\mu$ g/ml GM caused no ERG changes after vitrectomy and no histological abnormalities. Intraocular irrigation with 50  $\mu$ g/ml GM slightly diminished the b-wave and the oscillatory potential 1 and 2 weeks after vitrectomy. The intravitreal GM concentration was undetectable (<0.3  $\mu$ g/ml) in normal and vitrectomized eyes after intramuscular injection of 5 mg/kg GM. However, GM was detectable in the vitreous humor in aphakic/vitrectomized eyes, except for the eyes one day after surgery. Judging from the most susceptible ERG components and histological findings, the author recommends 100  $\mu$ g as a nontoxic and therapeutic dose of GM for an intravitreal injection in the treatment of bacterial endophthalmitis. The GM concentration in an intraocular irrigation solution used for vitrectomy should not exceed 20  $\mu$ g/ml.