

カプサイシン投与ラットにおける角膜上皮の変化

川上 淳子¹⁾, 片上千加子²⁾, 山本 節²⁾¹⁾国立神戸病院眼科, ²⁾神戸大学医学部眼科学教室

要 約

三叉神経障害が角膜上皮に及ぼす影響について検討する目的で、カプサイシン投与ラットにおける角膜上皮の変化について検討した。生後2日目の幼若ラットに、カプサイシン(100 mg/kg)または対照として溶解液のみの皮下注射を1回行い、生後7~28日目に眼球を摘出し、塩化金染色による角膜の神経分布、³H-チミジンオートラジオグラフィーによる角膜上皮細胞増殖動態、モノクローナル抗サブスタンス P(SP)抗体を用いた免疫組織化学染色による角膜上皮のSPの局在の検討を行った。カプサイシン投与群の角膜上皮では対照群と比較して、

接着性の低下、神経終末密度の減少、細胞増殖能の低下、SPの発現の減弱を認めた。以上の結果から、三叉神経障害による角膜上皮障害発生の一因として、角膜上皮の接着性の低下に加え、神経伝達物質であるSPの減少が関与すると推察される角膜上皮細胞増殖能の低下が考えられた。(日眼会誌 100: 653-659, 1996)

キーワード: 神経麻痺性角膜炎, カプサイシン, 角膜上皮細胞増殖, ³H-チミジンオートラジオグラフィー, サブスタンス P

Capsaicin-induced Corneal Epithelial Changes in Rats

Junko Kawakami¹⁾, Chikako Katakami²⁾ and Misao Yamamoto²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kobe National Hospital²⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

Abstract

To elucidate the mechanisms by which corneal sensory denervation causes corneal epithelial disorders, we investigated corneal epithelial changes in rats injected with capsaicin, which is known to desensitize the primary sensory neurons. Neonatal rats were injected with capsaicin (100 mg/kg) or only the vehicle as a control on the 2nd day after birth. Corneas were excised after 7~28 days and subjected to gold chloride staining, ³H-thymidine autoradiography, or immunohistochemistry using anti-substance P (SP) antibody. The results indicated poor attachment of corneal epithelium, decreased corneal nerve ending density, decreased ³H-thymi-

dine uptake by epithelial cells, and decreased expression of SP in the epithelial layer in rats injected with capsaicin compared with the control rats. This suggests that decreased proliferation of corneal epithelial cells associated with decreased SP as well as poor attachment of the epithelium is one of the causes of neuroparalytic keratopathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 653-659, 1996)

Key words: Neuroparalytic keratopathy, Capsaicin, Corneal epithelial cell proliferation, ³H-thymidine autoradiography, Substance P

I 緒 言

腫瘍・手術・角膜ヘルペスなどにより三叉神経が障害されると、遷延性角膜上皮欠損を伴う神経麻痺性角膜炎を生じることは臨床的にもよく知られている。これらの事実から、三叉神経が角膜上皮の恒常性維持および創傷治癒に重要な役割を果たしていることが示唆されている

が、その詳細については不明の点が多く残されている。

三叉神経障害に伴う角膜上皮障害の病態については、三叉神経障害の動物実験モデルを用いて検討が行われてきた。実験モデルの作成には、熱凝固^{1)~3)}・経頭蓋法^{4)~6)}などによる三叉神経切断法と、直接神経を破壊しない方法として、末梢知覚神経の感受性を低下させる物質として知られているカプサイシンを投与する方法⁷⁾⁸⁾とが知ら

別刷請求先: 654-01 兵庫県神戸市須磨区西落合3-1-1 国立神戸病院眼科 川上 淳子

(平成7年12月18日受付, 平成8年4月8日改訂受理)

Reprint requests to: Junko Kawakami, M.D. Department of Ophthalmology, Kobe National Hospital. 3-1-1 Nishiochiai, Suma-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 654-01, Japan

(Received December 18, 1995 and accepted in revised form April 8, 1996)

れている。これらの実験モデルにおいては、角膜上皮の菲薄化や接着性の低下、角膜上皮細胞分裂能の低下を示す組織学的所見や角膜上皮創傷治癒の遅延を認めることが報告されている。しかし、その角膜上皮における三叉神経の神経伝達物質であるサブスタンス P (substance P, SP) の発現についての詳細な検討や角膜上皮細胞増殖動態についての³H-チミジンオートラジオグラフィーを用いたの検索は行われていない。

そこで今回、我々は神経麻痺性角膜炎の発生機序解明の一助とする目的で、三叉神経障害の動物実験モデルとしてカプサイシン投与ラットを用いて、その角膜上皮の変化について、角膜上皮細胞増殖動態と角膜上皮における SP の局在とに焦点を当てて検討し、三叉神経障害が角膜上皮に及ぼす影響について検討したので報告する。

II 実験方法

実験動物には Wistar 系幼若ラット 80 匹 160 眼を使用した。カプサイシン (capsaicin) (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) (Sigma Chemical Co, MO, 米国) を、10% エタノールと 10% ツィーン 80 (Sigma Chemical Co, MO, 米国) を含む 0.9% 生理食塩水に溶解し、生後 2 日目のラットに 100 mg/kg の皮下注射を 1 回行った (40 匹 80 眼)。対照群として、カプサイシンを含まない溶解液のみの皮下注射を 1 回行った (40 匹 80 眼)。注射量は、いずれも体重 10 g 当たり 0.5 ml とした。経時的に前眼部を細隙灯顕微鏡で観察し、Cochet-Bonnet 角膜知覚計で生後 28 日目のラット角膜中央部の角膜知覚を瞬目反射により測定した (カプサイシン投与群 4 匹 8 眼、対照群 4 匹 8 眼)。生後 7, 14, 21, 28 日目に 10% 泡水クロラル腹腔内注射 (1 cc/体重 100 mg) によって死亡させた後、眼球を摘出し、以下の手法を用いて角膜上皮の変化を検討した。

1. 塩化金染色

角膜神経の組織学的検索のため、生後 28 日目のラット (カプサイシン投与群 5 匹 10 眼、対照群 5 匹 10 眼) の眼球を用い、Karen ら⁹⁾の方法に準じて、角膜に塩化金染色を施した。まず、強角膜片を 100% レモン果汁に 15 分、続いて、1% 塩化金溶液 (Sigma Chemical Co, MO, 米国) に 45 分浸漬した後、6 滴の水酢酸を滴下した 100 ml 蒸留水中に 5 時間保存した後、放射状切開を入れ上皮と実質を分離し脱水後、上皮の伸展標本をスライドガラス上にマウントし、角膜中央部の神経線維分布を光学顕微鏡で観察した。

2. ³H-チミジンオートラジオグラフィー

角膜上皮細胞増殖動態の検討のため、生後 7, 14, 21, 28 日目のラット (カプサイシン投与群各 5 匹 10 眼、計 20 匹 40 眼、対照群各 5 匹 10 眼、計 20 匹 40 眼) の眼球を摘出後、ただちに Dulbecco's minimum essential medium (DME) (GIBCO) 中で、³H-チミジン (Amersham,

100~130 Ci/mmol) (10 μ Ci/ml) で 37°C, 6 時間標識した後 10% ホルマリンで固定、強角膜片のパラフィン切片を作成した。既報¹⁰⁾の方法に準じて暗室内で 50% コニカ NR-M2 オートラジオグラフィー用乳剤に浸した後乾燥させ、シリカゲル在中の暗箱に収めて 4°C で保存し、1 週間の露出を行った。露出後暗室内においてフジレンドール (富士フィルム) で 5 分間現像し、フジレンフィックス (富士フィルム) で 5 分間定着後水洗し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。光学顕微鏡で角膜上皮を組織学的に観察し、各切片における³H-チミジンの取り込み上皮細胞数を計測し、切片の長さによる補正を行った。すなわち、同一倍率で各切片を撮影した写真をもとに最も短い切片の長さに対する各切片の比率を求め、それぞれの³H-チミジン取り込み上皮細胞数をその数値で除した。

3. 抗 SP 抗体を用いた免疫組織化学染色

角膜上皮におけるサブスタンス P の局在の検討のため、生後 14, 21, 28 日目のラット (カプサイシン投与群各 5 匹 10 眼、計 15 匹 30 眼、対照群各 5 匹 10 眼、計 15 匹 30 眼) の摘出眼球から得た強角膜片を 4% パラホルムアルデヒド溶液で 4°C, 2 時間固定し、30% スクロース/リン酸緩衝食塩水で 4°C, 2 時間浸漬し、厚さ 8 μ m の凍結切片を作成した。500 倍希釈のモノクローナル抗 SP 抗体 (UCB BIOPRODUCTS, SA) を一次抗体とした間接法による酵素抗体法染色を Vectastain Elite ABC キット (Vectastain 社) を用いて行った。

本動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に則して施行した。

III 結果

ラットの成長過程において、その体重・体長は、カプサイシン投与群と対照群の間には明らかな差異を認めなかった。

1. 細隙灯顕微鏡検査

実験期間中にわたって細隙灯顕微鏡による観察では、カプサイシン投与群、対照群ともに角膜混濁などの明らかな角膜の異常は認められなかった。



図1 ラット角膜知覚 (生後 28 日目)。

2. 角膜知覚

生後28日目において角膜知覚を測定した。対照群は 12.1 ± 3.3 mm, カプサイシン投与群は 6.6 ± 3.1 mm(数値は各群8眼のそれぞれの平均値 $\pm$ 標準偏差)で, カプサイシン投与群では, 対照群に比較して有意な角膜知覚の低下を認めた(t検定, $p < 0.01$) (図1)。

3. 塩化金染色

生後28日目の塩化金染色の結果を図2に示す。角膜上皮内神経終末(nerve ending)が先端が丸く肥厚した状態で観察された。カプサイシン投与群の角膜上皮では, 対照群と比較して角膜上皮内神経終末密度の減少が認められ

た(図2a)。また, 細くて長い直線化した神経線維(図2b)や多分岐の神経線維(図2c)など, 対照群ではみられない異常な神経線維が観察された。

4. ^3H -チミジンオートラジオグラフィ

^3H -チミジンオートラジオグラフィの結果を図3に示す。生後7, 14日目の角膜上皮の組織学的所見には, カプサイシン投与群と対照群の間に著明な差異は認めなかった(図3a, b, e, f)。カプサイシン投与群では, 生後21日目では角膜上皮の厚さはやや薄く, 上皮基底細胞の拡大・配列の乱れを認めた(図3c)。生後28日目では, 角膜上皮と基底膜との接着性の低下を示唆する所見が全例に

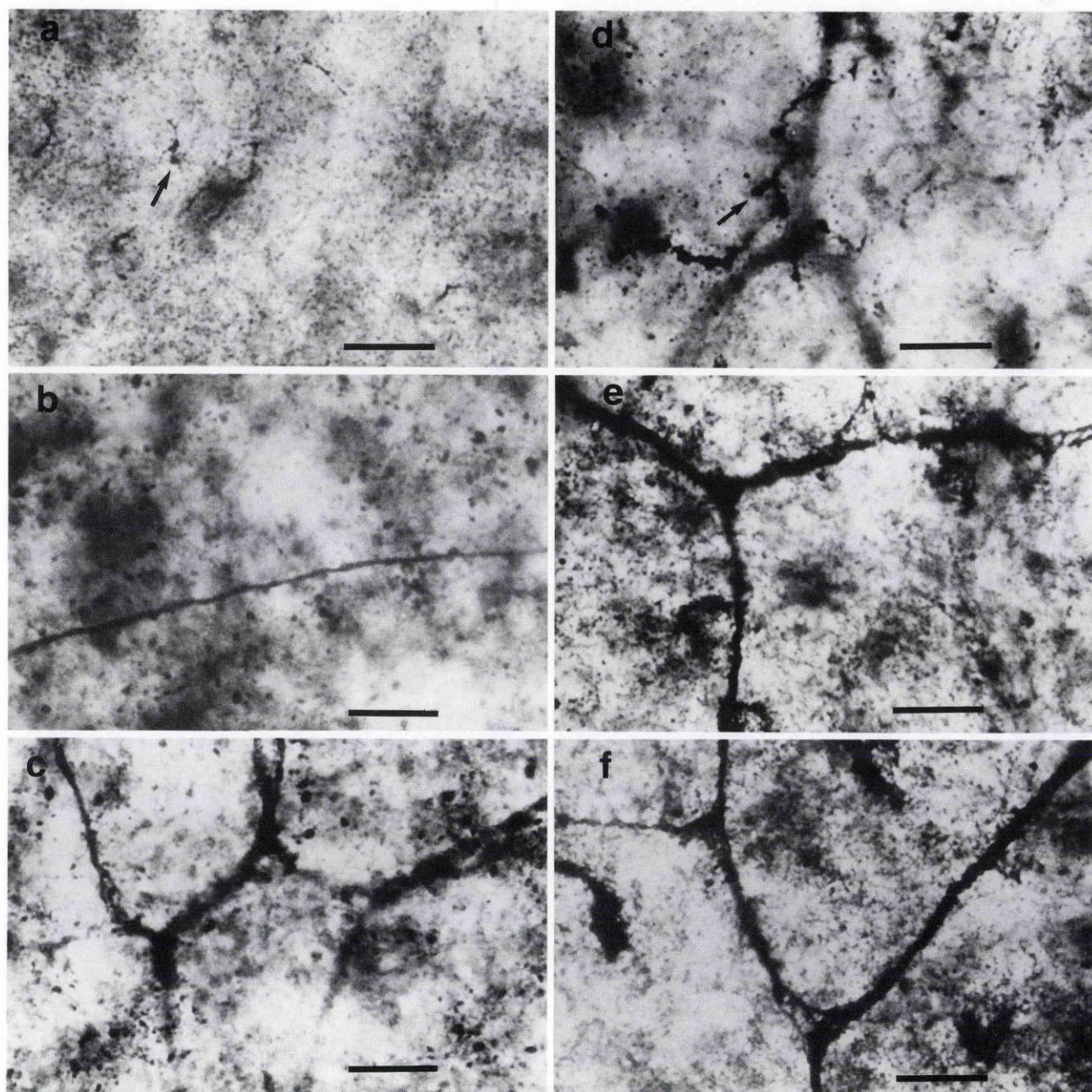


図2 ラット角膜上皮塩化金染色(生後28日目)。

a~c: カプサイシン投与群, d~f: 対照群。先端が丸く肥厚した状態(矢印)で観察されるのが角膜上皮内神経終末(nerve ending)である。バーは20 μm

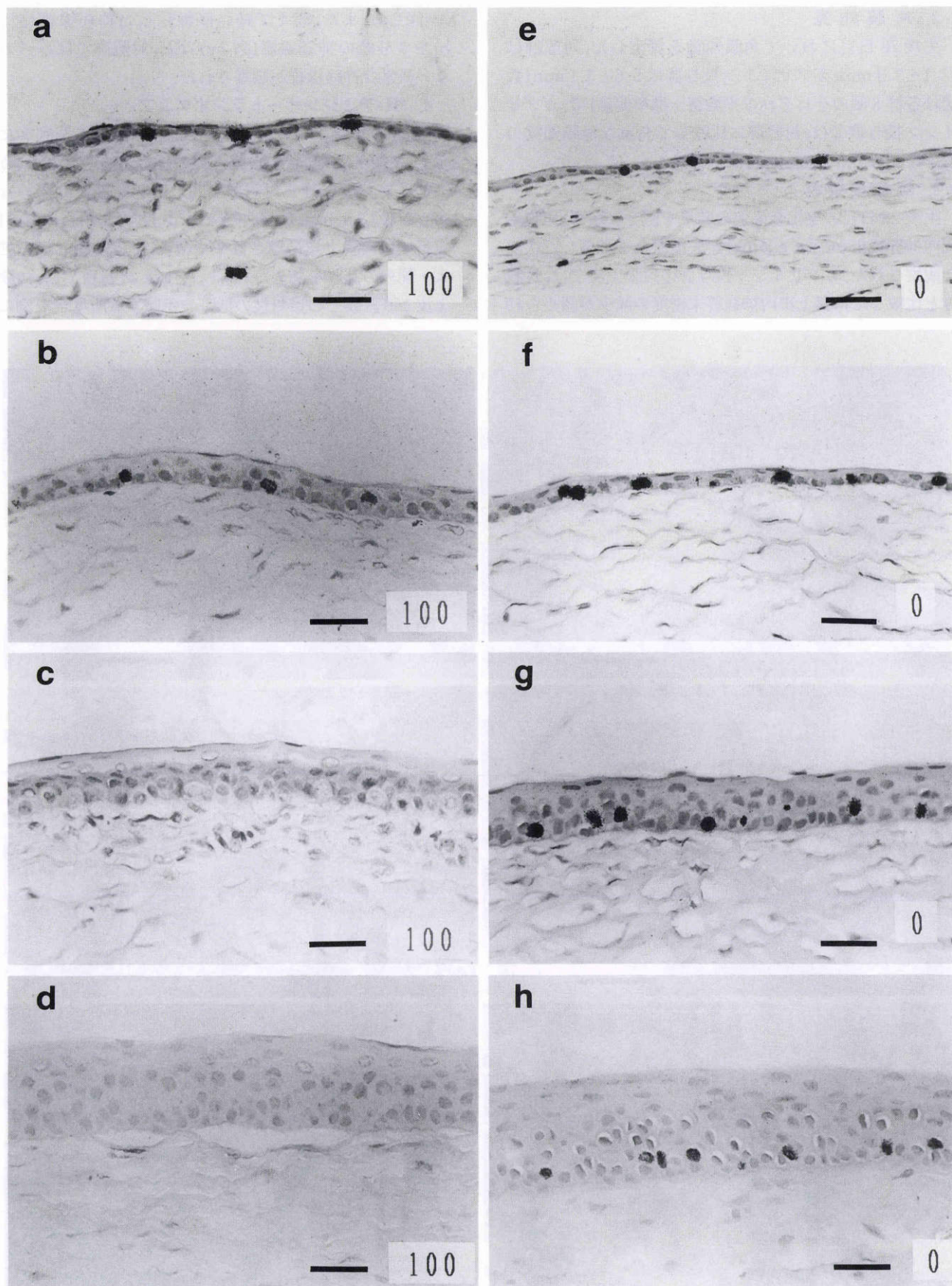


図3 ^3H -チミジンオートラジオグラフィー.

a~d: カプサイシン投与群, e~h: 対照群. a・e: 生後7日目, b・f: 生後14日目, c・g: 生後21日目, d・h: 生後28日目. 銀粒子の集積を認めているのが ^3H -チミジン取り込み細胞である. バーは20 μm

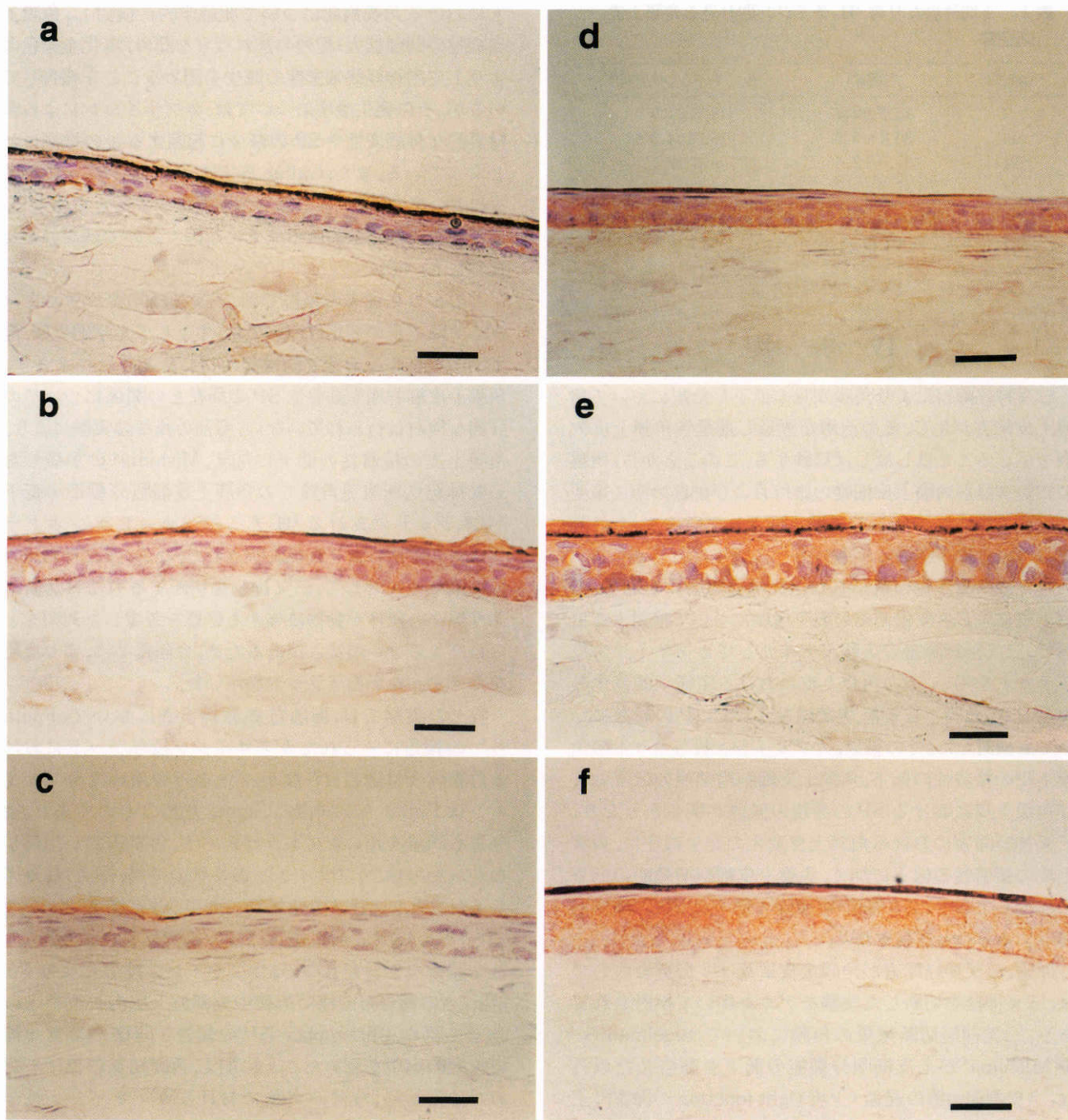


図4 モノクローナル抗サブスタンス P(SP)抗体を用いた免疫組織化学染色.

a~c: カプサイシン投与群, d~f: 対照群. a・d: 生後14日目, b・e: 生後21日目, c・f: 生後28日目.
バーは 20 μ m

認められた(図3d).

1切片当たりの ^3H -チミジンの取り込み上皮細胞数を計測し, 方法の項に記載したように切片の長さによる補正をした数値を表1に示す. 取り込み細胞数は, 対照群と比較して, カプサイシン投与群では生後7~28日目のいずれの時期においても減少しており, 生後14日目以降では有意差を認め(t検定, $p < 0.01$), 特に生後21, 28日目において顕著であった.

5. 抗 SP 抗体を用いた免疫組織化学染色

生後14, 21, 28日目のラット角膜における抗 SP 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果を図4に示す. 角膜上皮層に SP の局在を認めた(図4a~f). 対照群と比較して, カプサイシン投与群では, いずれの時期においても角膜上皮層における SP の染色性の低下を認めた(図4a~c).

表1 1切片当たりの³H-チミジン取り込み角膜上皮細胞数

日齢(日)	対照群	カプサイシン投与群
7	15.8±2.2	13.8±1.9
14	30.1±5.9	15.3±4.6*
21	37.0±2.4	6.3±2.1*
28	37.3±3.9	6.0±3.5*

数値は各群10眼のそれぞれ5枚の切片の平均値±標準偏差。

*:有意差を認めた(t検定, $p < 0.01$)。

IV 考 按

三叉神経障害により角膜知覚の低下した眼において角膜上皮障害が生じ、その治癒が遅延し遷延性角膜上皮欠損を生じることがしばしば経験する。このことから、角膜の知覚神経が角膜上皮細胞の維持および創傷治癒に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、その詳細については不明の点が多い。

我々は角膜知覚の低下した三叉神経障害において、角膜上皮に生じる変化とその発生機序について検討する目的で、三叉神経障害の実験モデルとしてカプサイシン投与ラットを用い、その角膜上皮における組織学的変化のみならず、角膜上皮細胞増殖能ならびにSPの局在についても検討した。その結果、カプサイシン投与ラットの角膜上皮の接着性の低下、角膜上皮細胞増殖能の低下および角膜上皮におけるSPの発現の減弱が明らかとなり、三叉神経障害における角膜上皮変化の発生機序は、角膜上皮の接着性の低下に加え、角膜上皮細胞増殖能の低下に起因しており、この細胞増殖能の低下はSPの減少が関与するものと推察された。

従来、三叉神経障害が角膜上皮に及ぼす影響については、三叉神経を切断した実験モデルを用いて検討されており、三叉神経切断家兎の角膜において、Sigelman⁴⁾やMishima⁴⁾が上皮細胞分裂能の低下を報告した以外は、上皮創傷治癒の遅延・上皮tight junctionの障害³⁾、上皮の菲薄化⁵⁾、上皮創傷治癒の遅延・上皮細胞間隙の拡大⁶⁾、など角膜上皮の接着性の低下を示唆する所見を認めることが中心に報告されてきた。一方、直接神経を破壊しない実験モデルでは、Fujita^ら^{7,8)}がカプサイシンを幼若ラットに投与すると、神経麻痺性角膜炎類似の角膜病変(軽度上皮混濁～潰瘍形成・血管侵入など)が出現することを発見し、本ラットが神経麻痺性角膜炎の実験モデルとなり得ることを報告した。

カプサイシンは赤胡椒の抽出成分で、末梢知覚神経の感受性を低下させる物質として知られているが、幼若小動物に投与すると末梢の無随神経線維の非可逆的変性をしばしばもたら¹¹⁾、さらに、末梢知覚神経における神経伝達物質もしくは調整物質と考えられているSPを枯渇させる作用が発見されている¹²⁾。Fujita^ら^{7,8)}は、本ラッ

トにおける角膜病変について組織学的に検討し、角膜上皮細胞の間隙拡大・配列の乱れなどを認め、塩化金染色により上皮内神経終末密度の減少を認めることを報告しているが、その発生機序については、カプサイシンによる非特異的な神経変性やSPの減少に起因するとの推測にとどまっている。また、Gallar^ら¹³⁾は、カプサイシン投与家兎において、角膜上皮創傷治癒が遅延することを報告し、それは上皮細胞分裂像の減少に起因するのではないかと推測している。

このように従来の報告では、三叉神経障害モデルにおける角膜上皮の変化については、主として光学顕微鏡、電子顕微鏡による形態学的検討が行われてきたにすぎず、角膜上皮細胞増殖動態やSPの局在との関係についての詳細な検討は行われていない。今回の我々の実験により、角膜上皮の接着性の低下に加え、Mishima⁴⁾の示唆した三叉神経切断家兎角膜での角膜上皮細胞分裂能の低下が、本ラットにおける³H-チミジンオートラジオグラフィの手法により直接証明された。なお、三叉神経障害の実験モデルとして、三叉神経を切断する方法は切断に伴う種々の操作が動物に与える影響を考慮した対照をとらねばならない煩雑さがあるため、今回我々は、より簡便なカプサイシン投与ラットを用いた。

我々の実験では、細隙灯顕微鏡検査において、Fujita^ら^{7,8)}の報告にみられたカプサイシン投与ラットにおける角膜病変は認められなかった。我々の用いたカプサイシンはFujita^らと同様にSigma社製のものであり、投与量も同量を用いたにもかかわらず、角膜病変が出現しなかったのは、カプサイシンの性状の差異、例えば、カプサイシンとして供する原植物の薬理効果の差異などが考えられる。しかし今回、細隙灯顕微鏡検査下では角膜に異常を認めなかったものの、カプサイシン投与によりFujita^ら⁸⁾の報告と同様に角膜中央部の上皮内神経終末の減少を認め、Christopher^ら¹⁴⁾の報告と同様に異常な神経線維の出現を認めたことに加え、角膜知覚の低下を認めたことから、今回の実験におけるカプサイシン投与ラットは、三叉神経障害の実験モデルとして適切であると考えられた。

本ラット角膜において、モノクローナル抗SP抗体を用いた免疫組織化学染色により、SPの染色性の低下を認めたことから、カプサイシン投与による角膜上皮の変化の発現の一因に、SPの減少が関与している可能性が示唆された。カプサイシンと角膜におけるSPの関係については、Tervo¹⁵⁾は、家兎角膜における抗SP抗体を用いた免疫組織化学染色による検討の結果、SPの染色性はカプサイシン投与により影響を受けなかったと報告しているが、Keen^ら¹⁶⁾は、マウス角膜におけるラジオイムノアッセイの手法を用いたSPの定量的結果、カプサイシン投与によりSPの含有量が80%減少したと報告している。Tervoの結果と我々の実験結果の違いについて

は, Tervo 自身が述べているようにラットと家兎ではカプサイシンに対する感受性の違い, もしくは, 角膜上皮における SP 結合部の量的または質的な差が存在することによるものと考えられる。

以上, 今回の実験結果から, カプサイシン投与ラットは三叉神経障害の実験モデルとして有用であり, 三叉神経障害による角膜上皮障害発生の一因として, 神経伝達物質である SP の減少が関与すると推察される角膜上皮細胞増殖能の低下ならびに角膜上皮の接着性の低下が考えられた。今回の実験結果は, 以前我々¹⁷⁾が報告した, 角膜輪部切開による角膜上皮細胞増殖能の低下, 上皮再生の遅延が, 切開による角膜神経終末の遮断に基づくものであることを裏付ける結果としても興味深い。

三叉神経障害による角膜上皮障害の発生機序については, SP の角膜上皮に及ぼす作用も含めて, さらに検討する必要があると考えられた。

本論文の要旨は, 第 60 回日本中部眼科学会(1994 年 9 月, 神戸)において報告した。

文 献

- 1) Sigelman S, Friedenwald JS: Mitotic and wound-healing of the activities of the corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 52: 46—57, 1954.
- 2) Alper MG: The anesthetic eye: An investigation of changes in the anterior ocular segment of monkey caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course. *Trans Am Ophthalmol* 72: 323—365, 1976.
- 3) Beuerman RW, Schimmelpfennig B: Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 69: 196—201, 1980.
- 4) Mishima S: The effects of the denervation and stimulation of the sympathetic and the trigeminal nerve on the mitotic rate of the corneal epithelium in the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 1: 65—73, 1957.
- 5) Araki K, Sun N, Kuwayama Y, Kinoshita S, Ohashi Y, Manabe R: Effect of trigeminal denervation on rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(Suppl): 469, 1990.
- 6) Araki K, Ohashi Y, Kinoshita S, Hayashi K, Kuwayama Y, Tano Y: Epithelial wound healing in the denervated cornea. *Curr Eye Res* 13: 203—211, 1994.
- 7) Fujita S, Shimizu T, Izumi K, Fukuda T, Same-shima M, Ohba N: Capsaicin-induced neuroparalytic keratitis-like corneal changes in the mouse. *Exp Eye Res* 38: 165—175, 1984.
- 8) Fujita S, Miyazono Y, Ohba N: Capsaicin-induced corneal changes associated with sensory denervation in neonatal rat. *Jpn J Ophthalmol* 31: 412—424, 1987.
- 9) Karen RS, Christopher SO, Lawrence FB: A modified gold chloride technique for optimal impregnation of nerves within corneal whole mounts and dura of the albino rat. *J Histochem Cytochem* 37: 269—271, 1989.
- 10) Katakami C, Sahori A, Kazusa R, Yamamoto M: Keratocyte activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1837—1845, 1991.
- 11) Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A, Joo F: Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 287: 157—169, 1975.
- 12) Jessel TM, Iversen LL, Cuellar AC: Capsaicin-induced depletion of Substance P from primary neurones. *Brain Res* 152: 183—188, 1978.
- 13) Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C: Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1968—1974, 1990.
- 14) Christopher SO, Karen RS, Lawrence FB: Sprouting of corneal sensory fibers in rats treated at birth with capsaicin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 112—121, 1991.
- 15) Tervo K: Effect of prolonged and neonatal capsaicin treatment on the substance P immunoreactive nerves in the rabbit eye and spinal cord. *Acta Ophthalmol* 59: 737—746, 1981.
- 16) Keen P, Tullo AB, Blyth WA, Hill TJ: Substance P in the mouse cornea: Effects of chemical and surgical denervation. *Neurosci Lett* 29: 231—235, 1982.
- 17) 川上淳子, 片上千加子, 山本 節: 角膜輪部切開の上皮創傷治癒に及ぼす影響. *あたらしい眼科* 10: 1345—1352, 1993.