

## 放射線照射家兎角膜のスペキュラーマイクロスコープによる観察

## —第1報 角膜の早期障害—

木内 貴博<sup>1)</sup>, 立崎 英夫<sup>2)</sup>, 武井 一夫<sup>3)</sup>, 中野 秀樹<sup>3)</sup>, 本村 幸子<sup>3)</sup>, 早川 吉則<sup>4)</sup><sup>1)</sup>筑波大学附属病院眼科, <sup>2)</sup>筑波大学臨床医学系放射線科<sup>3)</sup>筑波大学臨床医学系眼科, <sup>4)</sup>筑波大学基礎医学系放射線生物

## 要 約

電離放射線の角膜に及ぼす影響を検討するため、健康成熟白色家兎(n=5)の片眼にX線(250 kV, 12 mA) 20 Gyを照射し、照射後、比較的早期(照射1週後, 4週後)に細隙灯顕微鏡とスペキュラーマイクロスコープによる角膜上皮および内皮の生体観察を行った。スペキュラーマイクロスコープから得られた像はディジタイザーを用いて解析した。その結果、細隙灯顕微鏡では照射前後を通じて明らかな角膜障害は認められなかったが、スペキュラーマイクロスコープによる観察では照射4週後で角膜上皮平均露出細胞面積の有意な拡大を認めた。角膜内皮

細胞には明らかな変化は認められなかった。以上のように高線量のX線照射4週後には、細隙灯顕微鏡で角膜表層の変化が認められなくても、スペキュラーマイクロスコープで放射線の影響と思われる角膜上皮障害が観察された。一方、照射後4週までの角膜内皮障害は明らかではなかった。(日眼会誌 100: 783-789, 1996)

キーワード: 電離放射線, スペキュラーマイクロスコープ, 角膜上皮細胞, 角膜内皮細胞

A Specularmicroscopic Study on Irradiated Rabbit Corneas  
—Report I. Early Injury of the Cornea—Takahiro Kiuchi<sup>1)</sup>, Hideo Tatsuzaki<sup>2)</sup>, Kazuo Takei<sup>3)</sup>,  
Hideki Nakano<sup>3)</sup>, Sachiko Hommura<sup>3)</sup> and Yoshinori Hayakawa<sup>4)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, University of Tsukuba Hospital<sup>2)</sup>Department of Radiology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba<sup>4)</sup>Department of Radiation Biology, Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba

## Abstract

To evaluate the effects of ionizing radiation on the cornea, one eye of healthy mature albino rabbits (n=5) was irradiated with 20 Gy of X-rays (250 kV, 12 mA). Corneal observation was done with a slit-lamp biomicroscope and a specular microscope before irradiation, and follow-up observations were done at one week and 4 weeks after irradiation. Specular microscopic photographs were analyzed with a digitizer. Although slit-lamp biomicroscopy did not show any abnormal findings in the cornea, specular microscopy revealed a significant enlargement of the mean cell area of the superficial corneal

epithelium at 4 weeks after irradiation. There were no significant changes in the corneal endothelium during this study. These results strongly suggest that high doses of X-ray irradiation could induce corneal epithelial injury at the early phase, even when by slit-lamp biomicroscopy shows no abnormal findings in the cornea. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 783-789, 1996)

Key words: Ionizing radiation, Specular microscopy, Corneal epithelial cell, Corneal endothelial cell

別刷請求先: 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系眼科 本村 幸子  
(平成7年10月11日受付, 平成8年6月3日改訂受理)

Reprint requests to: Sachiko Hommura, M.D., PhD. Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba. 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japan  
(Received October 11, 1995 and accepted in revised form June 3, 1996)

## I 緒 言

正常組織に対する電離放射線の影響については、古くから多くの研究がなされてきたが、臨床的にこの影響は放射線治療の副作用として出現することがほとんどである。通常、放射線治療を施行する際には、目的とする病巣以外の正常組織の被曝をできるだけ最小限に抑えるために、可能な限り照射野が絞られる。しかし、疾患の性質やその解剖学的位置などにより病巣以外の組織の曝露が避けられない時には、結果として正常組織の被曝が問題となる。眼科領域においても、眼球およびその周囲組織の腫瘍性病変などに対しては放射線治療が有効であることが多く、現在でも重要な治療法の一つである。放射線感受性の極めて高い水晶体に関しては、これまで多くの研究が報告<sup>1)~3)</sup>されており、最近では網脈絡膜<sup>4)</sup>や視神経<sup>5)</sup>に対する障害も報告されている。一方、放射線治療の際に角膜障害の合併を認めることがしばしばあるにもかかわらず、放射線の角膜への影響を基礎的に検討したものは少ない。特に、スペキュラーマイクロスコープを用いた生体観察法により検討された報告は未だなされていない。そこで今回我々は、放射線源として電離放射線の一種である X 線を家兎眼球に照射し、その後の角膜上皮および内皮の変化をスペキュラーマイクロスコープを用いて生体観察を行い、照射後早期の細胞形態の変化について検討したので報告する。

## II 実験方法

### 1. 対象および X 線照射方法

対象には、体重 2.5~3.0 kg の健常白色家兎 5 匹を用いた。動物に対する取り扱いには「動物の保護及び管理に関する法律」ならびに「実験動物の飼養及び保管等に関

する基準」に従った。ウレタン 1.5 g/kg で経静脈的麻酔を行ったのち、片眼に開眼器を装着し、上下直筋に 4-0 絹糸で制御糸を設置して眼球を固定した。電離放射線として、250 kV, 12 mA の X 線を用いた。あらかじめコリメーター(防護用シールド)を作製しておき、これを使用した条件下で吸収線量が 20 Gy になるよう、片眼のみに一回照射を行った。このコリメーターは厚さ 5 mm の鉛板の中央部に楕円形(15 mm×20 mm)の穴を打ち抜いたもので、X 線はこの範囲を通過することにより、照射眼球以外の組織の被曝を防止するようにした(図 1)。他眼は対照として非照射眼とした。

### 2. 観察方法

照射前、照射 1 週間後、4 週間後において、手持ち細隙灯顕微鏡による前眼部の観察、およびスペキュラーマイクロスコープによる生体観察を行った。

#### 1) 手持ち細隙灯顕微鏡による観察

手持ち細隙灯顕微鏡(ZEISS 社製)を用いて前眼部の観察を行った。次いで、フルオレセイン染色下の角膜表層の観察を行った。

#### 2) スペキュラーマイクロスコープによる観察

スペキュラーマイクロスコープは甲南社製 CSP-580 を用いた。40 倍対物レンズの先端部分に少量のヒアルロン酸ナトリウムを付着させたのち、角膜に接触させ、角膜上皮および内皮の写真撮影を行った。観察部位は角膜中央部とした。フィルムは富士フィルム社製 P 1600 を用い、増感処理によって現象を行ったのち、手札サイズにプリントした。次に、甲南社製 cell analyzer system を用いて、頂点入力法により、角膜上皮は 40 個の細胞を測定して平均露出細胞面積を、角膜内皮は 100 個の細胞を測定して平均細胞面積・細胞密度・変動係数(CV 値)・六角細胞出現率をそれぞれ算出した。なお、本法における入力誤

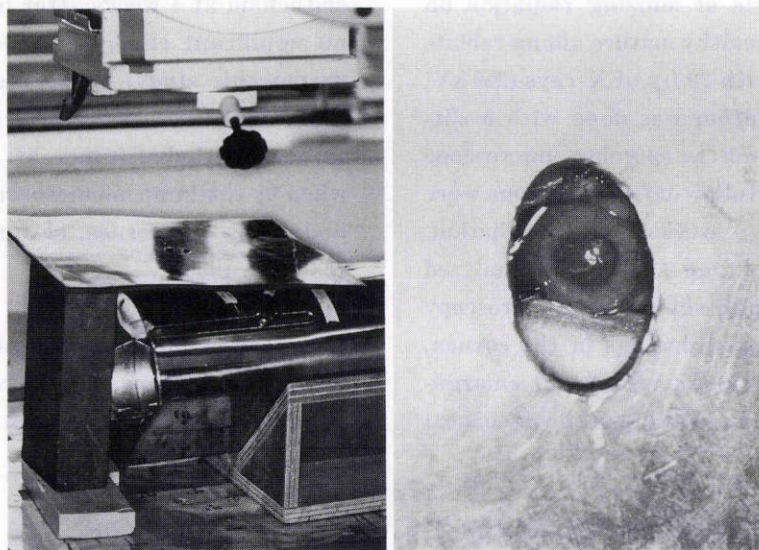
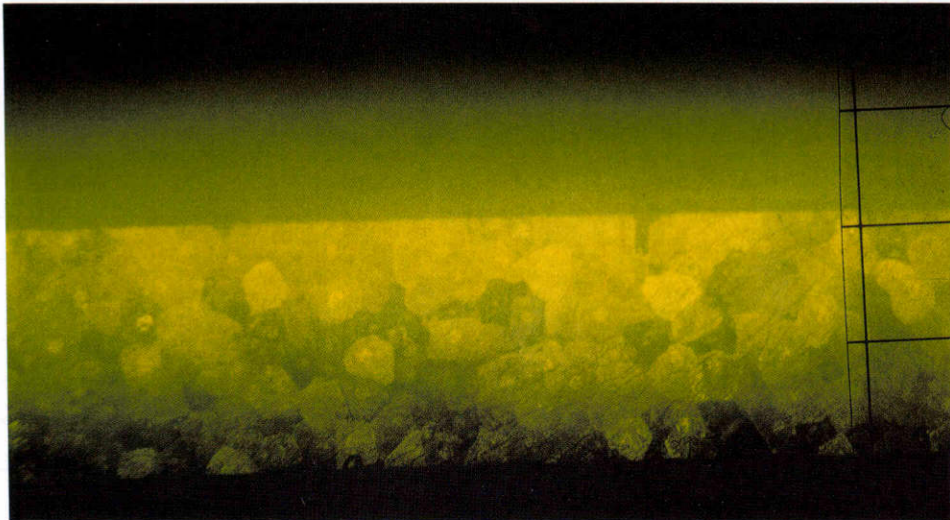
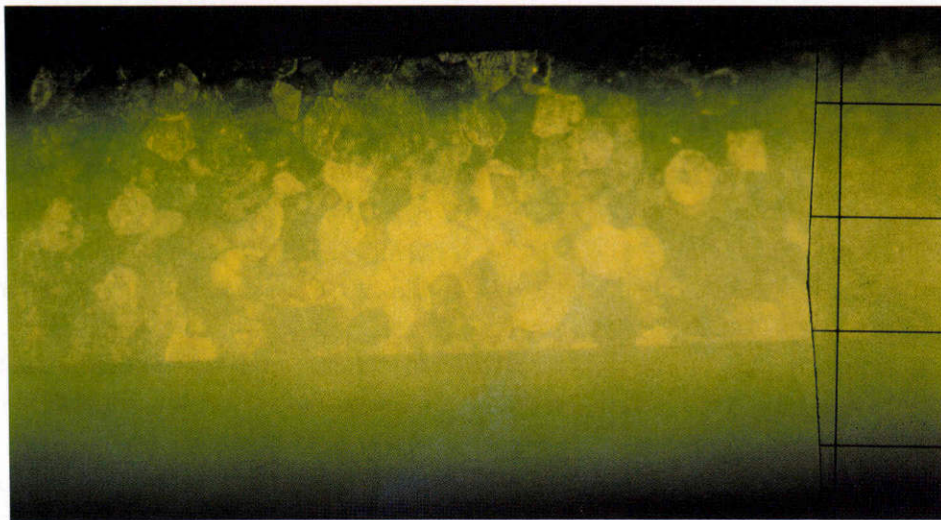


図 1 X 線照射方法。

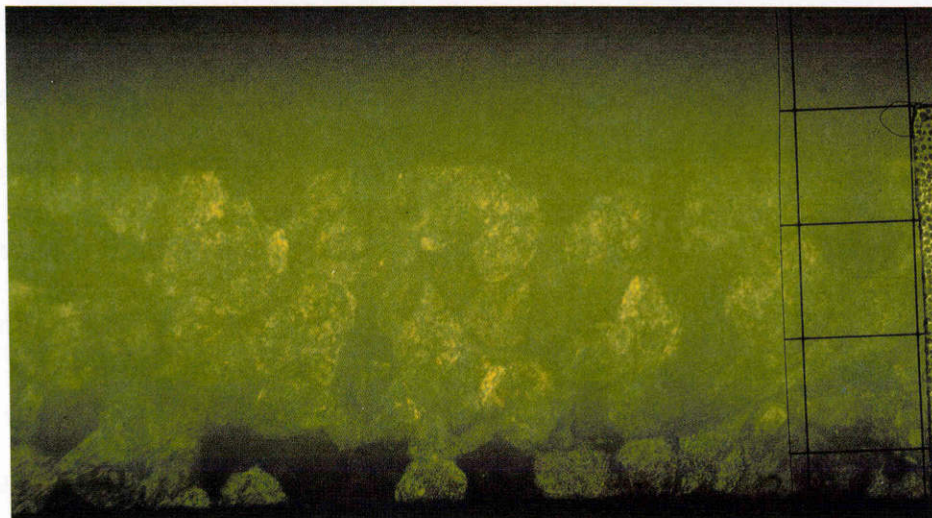
右は照射眼以外を鉛でシールドして上方から撮影したところ。左は X 線を照射しているところ。



A. 照射前：定常状態では明るさの異なる3種類の細胞, すなわち bright cell, medium cell, dark cell が明瞭に識別可能で, 平均露出細胞面積は  $468.2 \pm 19.4 \mu\text{m}^2$  であった.



B. 照射1週後：ごく軽度の細胞形態の不正が認められたものの, あまり大きな変化は認められなかった. 平均露出細胞面積は照射前と比較して有意差は認められなかった.



C. 照射4週後：明らかな巨大細胞の出現と細胞配列の著明な乱れを認め, 平均露出細胞面積は  $735.0 \pm 117.7 \mu\text{m}^2$  であった. スケールは  $100 \mu\text{m}$

図2 X線照射眼における照射前後の角膜上皮スペキュラーマイクロスコープ像.

差は5回測定の平均値のばらつきが4%以内であったことから無視できるものと思われた。

### 3. 統計学的解析

各パラメーターの測定値はすべて平均値±標準偏差で表し、各測定時点でのX線照射眼と非照射眼の平均値の比較には、F検定を行ったのち、Student's t-testまたはWelch's t-testを用い、照射眼・非照射眼それぞれの経時の変化についてはpaired t-testを用いて検定を行い、それぞれ危険率5%未満を有意とした。

## III 結 果

### 1. 細隙灯顕微鏡所見

照射眼においては、全例で照射1週間からわずかな眼瞼縁の腫脹と発赤および球結膜の充血を認めた。しかし、角膜には明らかな病的所見を認めず、フルオレセイン染色下の観察でも染色される部位は認められなかった。その他、前房中や水晶体には異常を認めなかった。

### 2. スペキュラーマイクロスコープ所見

#### 1) 角膜上皮

健常状態における家兎角膜上皮スペキュラーマイクロスコープ所見は、明るさの異なる3種類の細胞、すなわちbright cell, medium cell, dark cellが明瞭に識別可能で、平均露出細胞面積は $468.2 \pm 19.4 \mu\text{m}^2$ であった(図2A)。照射眼における照射1週後の角膜上皮では、軽度の細胞形態の不正が認められたものの、あまり変化はみられず、平均露出細胞面積は $491.6 \pm 17.1 \mu\text{m}^2$ で照射前および非照射眼と比較して有意差は認められなかった(図2B)。しかし、照射4週間後では明らかな巨大細胞の出現と細胞配列の著明な乱れを認め(図2C)、平均露出細胞面積は $735.0 \pm 117.7 \mu\text{m}^2$ と照射前および照射1週間後と比較して有意な拡大が認められ、非照射眼との間にも有意差が認められた(図3)。

#### 2) 角膜内皮

照射前と照射4週間後の角膜内皮のスペキュラーマイクロスコープ像をそれぞれ図4AとBに示す。照射前の平均細胞面積は $266 \pm 11 \mu\text{m}^2$ 、細胞密度は $3,757 \pm 151$ (細胞数/mm<sup>2</sup>)、変動係数(CV値)は $0.18 \pm 0.05$ 、六角細胞出現率は $70 \pm 3\%$ であり、細胞配列および形状は極めて均一に保たれていた。照射4週間後では、平均細胞面積 $272 \pm 15 \mu\text{m}^2$ 、細胞密度 $3,684 \pm 195$ (細胞数/mm<sup>2</sup>)、変動係数 $0.22 \pm 0.11$ 、六角細胞出現率 $67 \pm 2\%$ であった。これらのパラメーターは照射後4週間まででは有意な変化はみられなかったが、変動係数は経時的に増大する傾向にあった(図5A~D)。

## IV 考 按

現在治療に用いられている電離放射線には、X線を始めγ線・電子線・β線・陽子線などがあるが、今回の実験ではX線を線源として用いた。X線およびこれと線質の

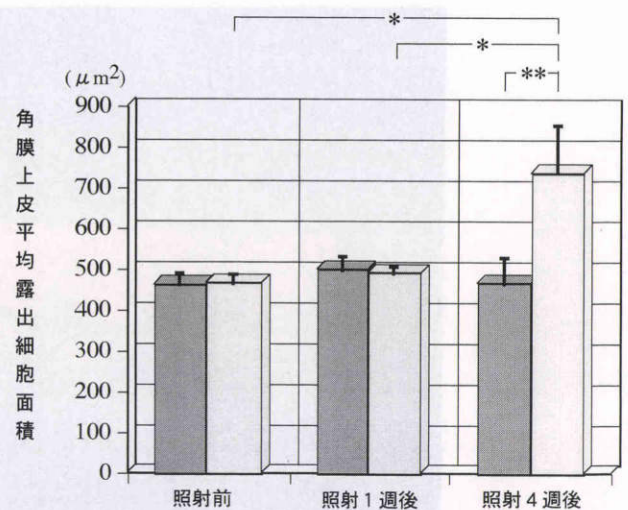
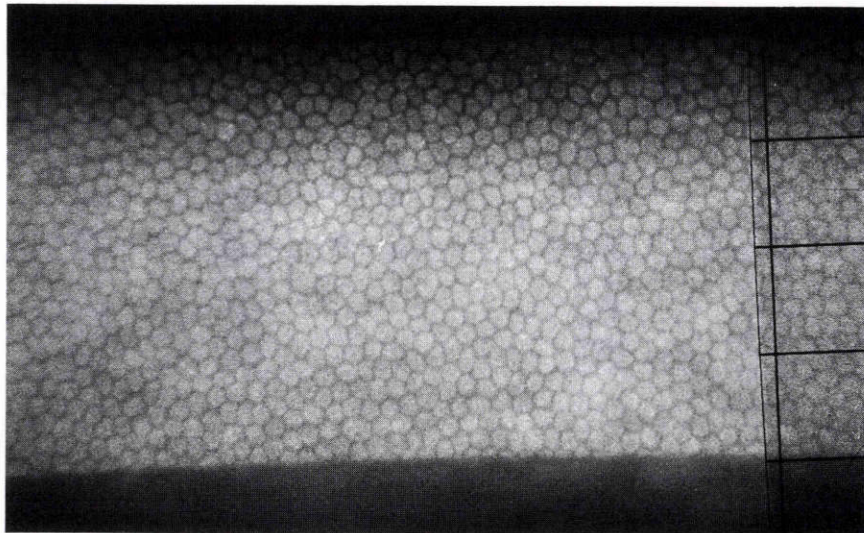


図3 X線照射前後における角膜上皮の平均露出細胞面積の変化。

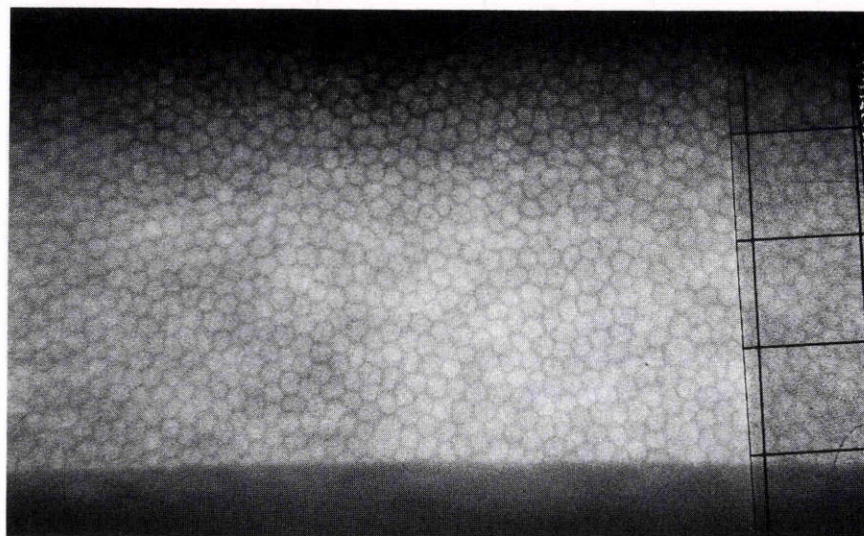
X線照射眼では、照射4週間後に照射前・照射1週間および非照射眼と比較して有意な拡大が認められた。■：非照射群，□：照射群。平均値±標準偏差を表す。\*： $p < 0.05$ ，\*\*： $p < 0.005$ 。

類似しているγ線によって角膜障害が引き起こされる線量について、実験的に追中<sup>6)</sup>は2,500 rad(25 Gy)で表層角膜炎を認め、Grabenbauerら<sup>7)</sup>は45 Gyで角膜潰瘍が出現することを報告した。一方、臨床的に放射線治療に合併した表層性角膜炎の発症線量について、能勢ら<sup>8)</sup>は400~4,300 rad(4~43 Gy)とかなりの幅があったが、25 Gy程度で細隙灯顕微鏡による観察レベルで検出可能な角膜障害が出現することが多いとした。以上のごとく、角膜障害を引き起こす線量にはばらつきがあるが、照射条件や線質などが報告者により異なるため、これまでの報告結果を単純に比較することは不可能である。今回我々は、放射線の角膜に対する影響の臨床的意義を明確にするため、照射線量を臨床における常用治療線量の最大値に近い20 Gyに絞って検討した。そして、この線量では照射4週間までは、細隙灯顕微鏡による観察レベルでは角膜に明らかな異常を認めなかった。また、今回用いた放射線遮蔽法では、線量分布の上から照射眼以外の眼組織、特に涙腺組織の被曝がほとんど皆無であったため、X線の角膜への影響の評価にあたり、涙液の関与を除外できると思われた。

これまで放射線の角膜への影響を形態学的に検討したものは、そのほとんどが*in vitro*によるもので<sup>6)7)9)10)</sup>、スペキュラーマイクロスコープを用いて*in vivo*で検討されたものはない。スペキュラーマイクロスコープの最大の利点は、角膜内皮および上皮の生体観察が可能なことであり、現在まで臨床のみならず種々の実験的研究にも応用されてきた。角膜内皮については、機器の改良により検査法が非常に簡便になったばかりでなく、評価法もほぼ確立しているが<sup>11)12)</sup>、角膜上皮の観察は、内皮の観察に



A. 照射前：細胞配列および形状は均一に保たれている。



B. 照射4週後：特に異常は認められない。スケールは100  $\mu\text{m}$

図4 X線照射眼における角膜内皮のスペキュラーマイクロスコープ像。

比べて観察手技が煩雑で<sup>13)~15)</sup>、しかも得られた画像に対しては未だ確立された評価法がない。最近、Tsubotaら<sup>16)17)</sup>は、角膜上皮最表層に露出した細胞の平均面積が鋭敏なパラメータであることを報告し、面積の拡大は糖尿病患者、連続装用コンタクトレンズ使用者、インドメタシン点眼中の白内障術後患者などでみられ、この原因として、角膜上皮の物質代謝異常の存在が確認されていることから<sup>18)19)</sup>、上皮細胞の分化異常や細胞分裂の抑制が起り、面積が拡大する考えた。また、面積の縮小は乾性角結膜炎でみられることがLempら<sup>20)</sup>により報告されており、未熟な表層細胞の脱落の亢進が原因であるとした。

放射線による細胞障害の発現機序は未だ確定していないが、現在では細胞の間期死と、それを免れた細胞障害の存在が明らかとなっており<sup>21)</sup>、後者には細胞の分裂死をはじめ、細胞分裂遅延、突然変異、細胞分化の異常、細胞内

代謝異常などといった非致命的細胞障害が含まれる。放射線照射後の角膜上皮の形態的变化について、荻田<sup>9)</sup>は放射線照射直後に表層細胞の崩壊脱落を認めたとしている。一方、追中<sup>10)</sup>は表層性角膜炎が出現する場合は照射後5週以降で認められ、病変の出現した原因は、基底細胞の障害に伴う表層細胞の変形と脱落であったとしており、さらに、基底細胞の分裂が抑制されていることを確認した。また、照射線量によっては表層性角膜炎は認められないものの、組織学的に基底細胞の異常を認めたとしている。これらを放射線生物学的に考察すると、荻田の結果は角膜表層細胞の間期死により引き起こされた変化をとらえたものであり、追中の結果は上皮基底細胞に対する非致命的放射線障害によりもたらされたものであると考えられる。今回我々は、スペキュラーマイクロスコープを用いることにより、放射線の角膜への早期の影響を初めて経時的に *in vivo* で観察することが可能であった。そ

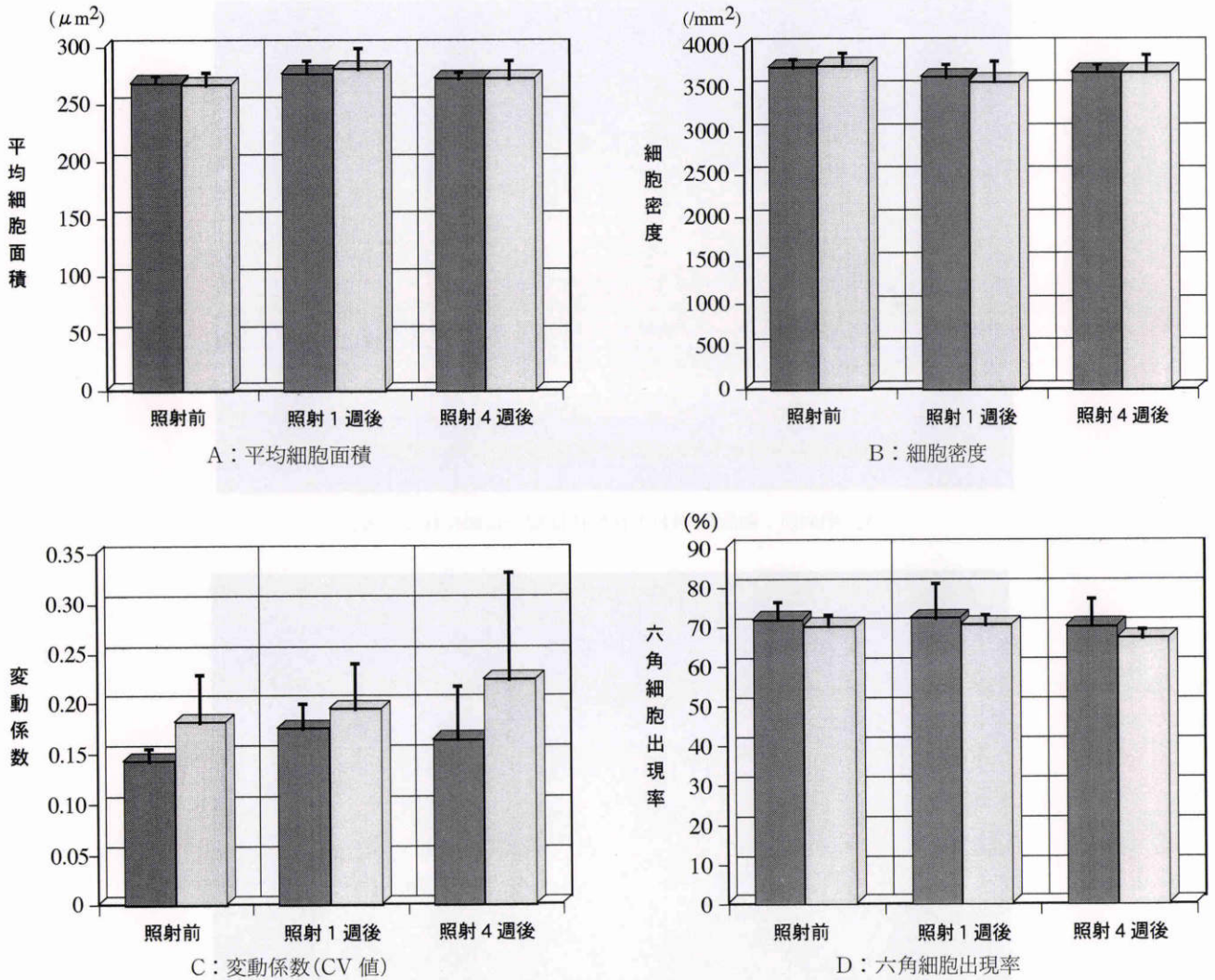


図5 X線照射前後における角膜内皮細胞の各種パラメータの変化。

■: 非照射群, □: 照射群. 各パラメータの平均値±標準偏差を表す. いずれのパラメータにおいても照射後4週までで有意な変化は認められなかった.

の結果, 照射4週後で上皮表層細胞の有意な細胞面積の拡大と, より明らかな細胞配列の乱れを認めた. このことは, 追中<sup>6)</sup>の実験結果とよく類似しており, 今回用いた条件のX線では, すでに分化を開始した翼細胞や表層細胞に対しては決定的な損傷を与えるに至らず, これまで *in vivo* で放射線による基底細胞の分裂抑制が認められている事実から考察しても<sup>22)</sup>, 放射線感受性の高い基底細胞に非致命的損傷が与えられたと考えることもできる. 最近, 上皮の恒常性の維持に各種サイトカインの関与<sup>23)</sup> や角膜輪部上皮に存在するといわれている幹細胞の役割<sup>24)</sup> が指摘されている. しかし, これらに及ぼす放射線の影響はこれまで検討されておらず, 今回認められた異常の原因を放射線の基底細胞に対する障害のみに求めるには無理がある.

今回の実験では, 細胞レベルで形態的異常がみられたにもかかわらず, 細隙灯顕微鏡では角膜障害は観察されなかった. 実験的に, 放射線照射により上皮基底細胞の異

常が誘発され, それに伴って変形を来した表層細胞は易脱落性であることが確かめられており, 放射線治療後の難治性角膜炎の一因である可能性が指摘されている<sup>6)</sup>. よって, 一見正常と思われる今回の角膜においても, 角膜上皮の機械的侵襲などに対する抵抗性は低下している可能性がある.

一方, 今回X線照射後4週までは, 明らかな角膜内皮細胞の異常はなかった. 侵襲により角膜内皮細胞が障害を受けると, 細胞分裂, 伸展, 移動による創傷治癒機転が働く<sup>25)</sup>. しかし, 常にturn overしている上皮細胞と比較すると, 定常状態における角膜内皮細胞は分裂増殖という細胞機能は低いと考えられ, X線に対する感受性も上皮細胞とは異なっていることが予想される. 今回の結果は, このような差によりもたらされたと思われる. すなわち, 頻りに増殖しない細胞であるがゆえにX線による感受性も低く, 照射後早期には明らかな形態的異常が認められなかった可能性が高い. しかし, 電離放射線の生体組

織に対する影響は、早期障害のみならず、照射後かなり時間が経過した後も晩期障害として出現することがある。しかも、放射線の生体障害機構については未だ不明な点も多い。よって、角膜に対する電離放射線の影響を生体において検討するには、さらに長期にわたる観察が必要である。

本論文の要旨は、第99回日本眼科学会総会において発表した。

#### 文 献

- 1) Upton AC, Christenberry KW, Melville GS, Furth J, Hurst GS: The relative biological effectiveness of neutrons, X-rays, and gamma rays for the production of lens opacities: Observations on mice, rats, guinea-pigs, and rabbits. *Radiology* 67: 686—696, 1956.
- 2) Geeraets WJ, Ham WT, Mueller HA, Williams RC, Cleary SF: Effects of acute and protracted ionizing radiation on the rabbit lens. *Acta Ophthalmol* 49: 817—855, 1971.
- 3) Lipman RM, Tripathi BJ, Tripathi RC: Cataracts induced by microwave and ionizing radiation. *Surv Ophthalmol* 33: 200—210, 1988.
- 4) 大久保裕史, 池田芳良, 鈴木清巳: 放射線網膜症の1例. *眼紀* 46: 347—350, 1995.
- 5) 吉井 大, 沖坂重邦, 柳川洋一, 瀧口博司: 下垂体腫瘍術後の放射線療法により視神経障害を生じた1例. *日眼会誌* 99: 739—744, 1995.
- 6) 追中松芳: 放射線照射による角膜遅発障害の実験的研究. 第1報. 形態的観察. *日眼会誌* 84: 2004—2019, 1980.
- 7) Grabenbauer GG, Herbst MA, Völcker HE: Effekte der fraktionierten Bestrahlung am Auge des Kaninchens. Eine histo-pathologische Studie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 193: 283—286, 1988.
- 8) 能勢晴美, 本村幸子: 放射線治療による眼障害. *眼科* 34: 1107—1113, 1992.
- 9) 荻田昭三: 放射線照射家兎角膜の走査型電子顕微鏡観察. 第1報. 角膜上皮の早期障害. *眼紀* 28: 532—542, 1977.
- 10) 追中松芳: 放射線照射による角膜遅発障害の実験的研究. 第2報. オートラジオグラフィによる観察. *日眼会誌* 85: 277—285, 1981.
- 11) 大原國俊, 水流忠彦, 伊野田繁: 角膜内皮細胞形態のパラメーター. *日眼会誌* 91: 1073—1078, 1987.
- 12) Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF: Comparison of the corneal endothelium in an American and Japanese population. *Arch Ophthalmol* 103: 68—70, 1985.
- 13) 葛西 浩, 江波戸文秀, 植田達子, 東野 巖, 崎元卓, 北野周作: 角膜上皮の Specular Microscopy. *眼紀* 31: 1704—1710, 1980.
- 14) Tsubota K: A contact lens for specular microscopic observation. *Am J Ophthalmol* 106: 627—628, 1988.
- 15) 中野秀樹: 角膜上皮のスペキュラーマイクロスコープ. *日眼会誌* 93: 775—780, 1989.
- 16) Tsubota K, Yamada M, Naoi S: Specular microscopic observation of normal human corneal epithelium. *Ophthalmology* 99: 89—94, 1992.
- 17) Tsubota K, Yamada M, Naoi S: Specular microscopic observation of human corneal epithelial abnormalities. *Ophthalmology* 98: 184—191, 1991.
- 18) Tsubota K, Kenyon KR, Cheng HM: Hard contact lens-induced metabolic changes in rabbit corneas. *Exp Eye Res* 49: 769—775, 1989.
- 19) Ohashi Y, Matsuda M, Hosotani H, Tano Y, Ishimoto I, Fukuda M, Manabe R: Aldose reductase inhibitor (CT-112) eyedrops for diabetic corneal epitheliopathy. *Am J Ophthalmol* 105: 233—238, 1988.
- 20) Lemp MA, Gold JB, Wong S, Mahmood M, Guimaraes R: An *in vivo* study of corneal surface morphologic features in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Am J Ophthalmol* 98: 426—428, 1984.
- 21) Tobias CA, Blakely EA, Ngo FQH, Yang TCH: Radiation Biology in Cancer Research. In: Meyn RE, et al (Eds): Raven Press, New York: 195—230, 1980.
- 22) Rubin NH: Influence of the circadian rhythm in cell division on radiation-induced mitotic delay *in vivo*. *Radiat Res* 89: 65—76, 1982.
- 23) 西田幸二, 外園千恵, 山本修士: 角膜疾患への分子生物学の挑戦—ウイルス性角膜疾患の診断と角膜創傷治癒機序の解明—. *あたらしい眼科* 12: 177—189, 1995.
- 24) Cotsarelis G, Cheng S, Dong G, Sun T, Lavker RM: Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57: 201—209, 1989.
- 25) Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR: The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 89: 531—590, 1982.