

表皮ぶどう球菌で誘発した家兎角膜感染眼モデルの作製

福田 正道, 井上 周, 佐々木一之

金沢医科大学眼科学教室

要 約

目 的: 抗生・抗菌剤の眼内移行動態の基礎的検討の多くは正常眼で行われており, 細菌感染眼での検討は極めて少ない。表皮ぶどう球菌を起炎菌とする感染眼を作製し, その病像とこの感染眼におけるフルオロキノロン系抗菌点眼剤の房水内移行動態について検討した。

方 法: 感染誘発は 1×10^4 cfu/ml 菌液 50 μ l の角膜実質内注射により行った。誘発された感染眼モデルの角膜炎の特徴は, 境界鮮明な限局性の隆起した潰瘍で周囲の角膜が比較的透明なことであった。

結 果: この感染モデル眼は比較的高い再現性 (78.6%) をもって作製することができた。また, 本モデルでのオフロキサシン点眼後の房水内移行は非感染眼の約 2 倍であった。

結 論: 薬剤の感染眼での薬物動態を検討する上で本モデルは有用と考える。(日眼会誌 103 : 506—511, 1999)

キーワード: 外眼部細菌感染, 動物モデル, 表皮ぶどう球菌, フルオロキノロン, 薬剤眼内動態

An Animal Model of Corneal Bacterial Infection Induced by Intra-corneal Injection of *Staphylococcus Epidermidis*

Masamichi Fukuda, Amane Inoue and Kazuyuki Sasaki

Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University

Abstract

Purpose: Pharmacokinetic studies of anti-bacterial agents for infectious eye diseases have usually been performed using non-infected rabbit eyes with few studies using infected animal eyes.

Methods: In order to induce bacterial corneal inflammation in rabbit eyes, an intra-corneal injection of *Staphylococcus epidermidis* was done. The applied bacterial dose was 50 μ l of 1×10^4 cfu/ml.

Results: The characteristic corneal change was well-defined ulcer formation located in a limited area and relatively elevated. The area surrounding the infected part of the cornea was rather transparent. Using these infected eyes as models, the intra-

ocular drug dynamics of 0.3% Ofloxacin were examined. The model was successfully induced in 78.6% of the rabbits. The drug concentration in the aqueous humor was 2 times higher in the infectious eyes than in the control eyes.

Conclusion: The model might be useful for drug dynamic studies in infected eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 506—511, 1999)

Key words: External bacterial ocular inflammation, Animal model, *Staphylococcus epidermidis*, Fluoroquinolones, Intra-ocular drug dynamic

I 緒 言

眼感染症の臨床的および基礎的研究を行う目的で, 感染眼モデルの作製が数多く試みられている。特に, 眼感染症の起炎菌になりやすい緑膿菌をはじめ, 黄色ぶどう球菌, 表皮ぶどう球菌などによる実験的角膜感染モデルが作製されている^{1)~7)}。全身および局所投与された薬剤の眼内移行動態の検討では正常動物眼で検討されている

が^{8)~11)}, 感染眼での眼内移行動態を知る目的で, 感染眼モデルの作製を試みた報告⁴⁾¹²⁾は数少ないのが現状である。本研究はしばしば, 眼感染症の起炎菌となる弱毒菌である表皮ぶどう球菌による家兎角膜感染眼モデルの作製を試みるとともに, その感染眼モデルにおける抗菌剤の局所投与時の眼房水内薬剤移行動態を検討したものである。

別刷請求先: 920-0293 石川県河北郡内灘町字大学 1-1 金沢医科大学眼科学教室 福田 正道
(平成 9 年 7 月 25 日受付, 平成 11 年 2 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to: Masamichi Fukuda, Ph.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada-machi Kahoku-gun, Ishikawa, 920-0293, Japan

(Received July 25, 1997 and accepted in revised form February 6, 1999)

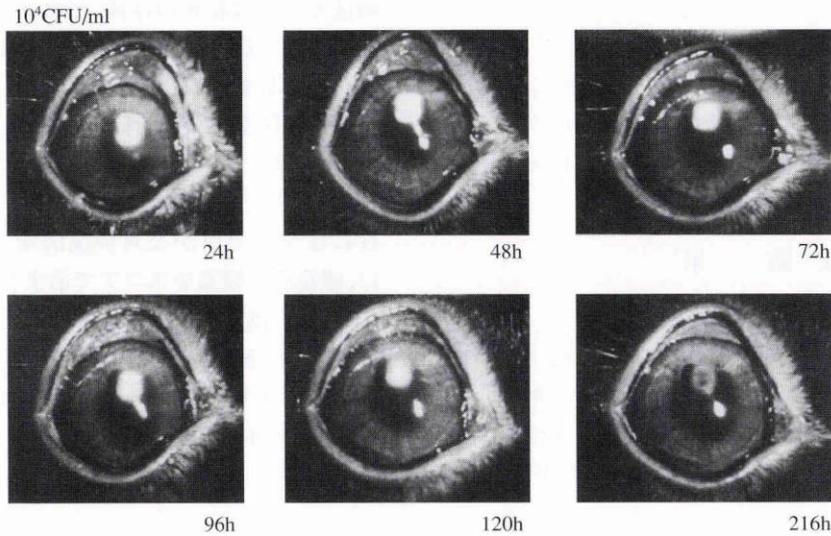


図 1 表皮ぶどう球菌誘発家兎角膜感染眼の経過観察.

II 実験材料および方法

1. 実験動物

ダッチ種雄有色家兎(体重 2.0~3.0 kg)で前眼部に異常がないもの(14 匹)を実験に使用した。

2. 使用細菌

金沢医科大学中央検査室から分与された *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) を普通寒天培地で培養し, その培地から 1 白金耳取り 1 ml の液体培地(SCD ブイヨン)に接種, 37°C で 16 時間振蕩培養した(前培養)。

前培養で得られた菌液から 30 μ l 採取し, 再度 1 ml の液体培地に接種し, 6 時間 37°C で振蕩培養した(本培養)。

本培養終了後, 培養液 100 μ l の生菌数を測定した。測定方法は, 本培養液を 10^6 倍に希釈して普通寒天培地にその 100 μ l を取り出し, 37°C で培養した。24 時間後コロニー数を測定し, 生菌数を算出した。家兎眼には本培養液を 10^4 倍希釈して用いた。

3. 菌接種法

家兎角膜実質内注入法: 0.4% 塩酸オキシプロカイン(ベノキシール® 0.4% 液, 参天製薬)局所麻酔剤で家兎角膜中央部実質内に 1×10^4 cfu/ml の菌液 50 μ l を 26 G 針で注入した。

4. 臨床像の経過観察

菌接種後, 細隙灯顕微鏡下で前眼部(結膜, 角膜, 前房および虹彩など)を菌接種 24 時間から 9 病日後まで観察した。また, 前眼部の所見は細隙灯顕微鏡写真により記録した。前眼部感染症状態, 炎症の変動は Draize 法¹³⁾を変法した家兎角膜感染症採点基準に従い, スコア化したものをもって評価した¹¹⁾¹⁴⁾。

5. 病理学的検索

菌接種群および対照群(培養液のみ接種)の家兎を処置 1 病日後, 3 病日後および 9 病日後に過剰ペンタバルビタールナトリウム(ネンプタル®)で屠殺し, 眼球を摘出後, 直ちに 2.5% グルタルアルデヒドで固定し, パラフィン抱埋した後, 切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い, 光学顕微鏡で観察し, 角膜組織の傷害の程度を検索した。

6. 薬剤の感染眼内移行動態

0.3% オフロキサシン(OFLX)(タリビット点眼液®, 参天製薬)を菌接種 3 病日, 9 病日に結膜嚢内に 1 回 50 μ l, 15 分毎計 3 回正確に点眼し, 最終点眼 1 時間後に点眼麻酔下で 26 G 針で前房水約 100 μ l を採取し, これを試料とした。また, 菌を含まない培養液を家兎に注入し, 同

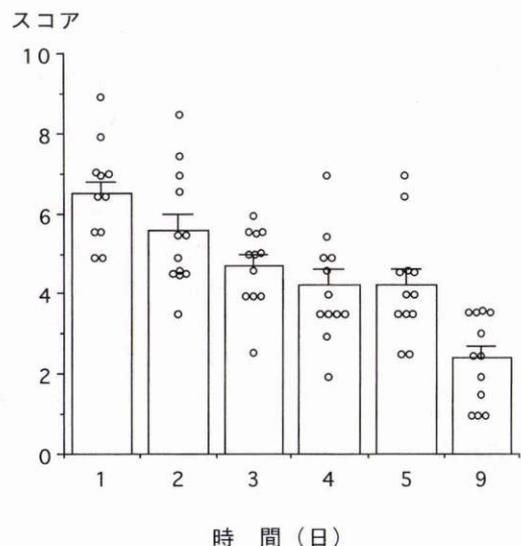


図 2 表皮ぶどう球菌誘発家兎角膜感染眼のスコア判定。平均値±標準偏差, n = 12

様に実験を行った。

OFLX の房水中の濃度は高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で測定した。HPLC の条件はカラムに Shim-pack CLC-ODS を使い、移動相は $0.04 \text{ M H}_3\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN} = 80/20 \text{ (V/V)}$ 、カラム温度は 40°C 、流速は 1.0 ml/min 、検出は $\text{Ex/Em} = 295 \text{ nm}/504 \text{ nm}$ であった。

III 結 果

1. 表皮ぶどう球菌による感染眼の経過

菌液 10^6 cfu/ml ($50 \mu\text{l}$) を角膜実質内に注入後、菌液注入が円滑にできなかった2眼は早期から極めて強い炎症症状が誘発されたので対象外とした。14眼中12眼に目指す前眼部炎症が誘発された。12眼でみられた平均的な

病像としては結膜の浮腫、充血は全例で1病日には出現し、第3~4病日までこれらが観察され、以後は徐々に消退し5病日までには全例でこれらが消失した。眼分泌物は菌接種後1~2病日は多かったが、第3病日以後は減少した。菌注入部を中心に限局した白色潰瘍が出現したが、その広がりには最大約4~5mmまでであった。第9病日には全例で僅かな角膜混濁を残すまでとなった(図1)。感染眼の経過をスコアで示すと、1病日では 6.5 ± 0.3 (平均値±標準偏差) [変動係数(CV) = 4.62%] ($n=12$)、2病日では 5.6 ± 0.4 (CV = 6.15%) ($n=12$)、3病日では 4.7 ± 0.3 (CV = 4.62%) ($n=12$)、4病日では 4.2 ± 0.4 (CV = 6.15%) ($n=12$)、5病日では 4.2 ± 0.4 (CV = 6.15%) ($n=12$) であり、9病日では 2.4 ± 0.3 (CV = 4.62%) ($n=12$)

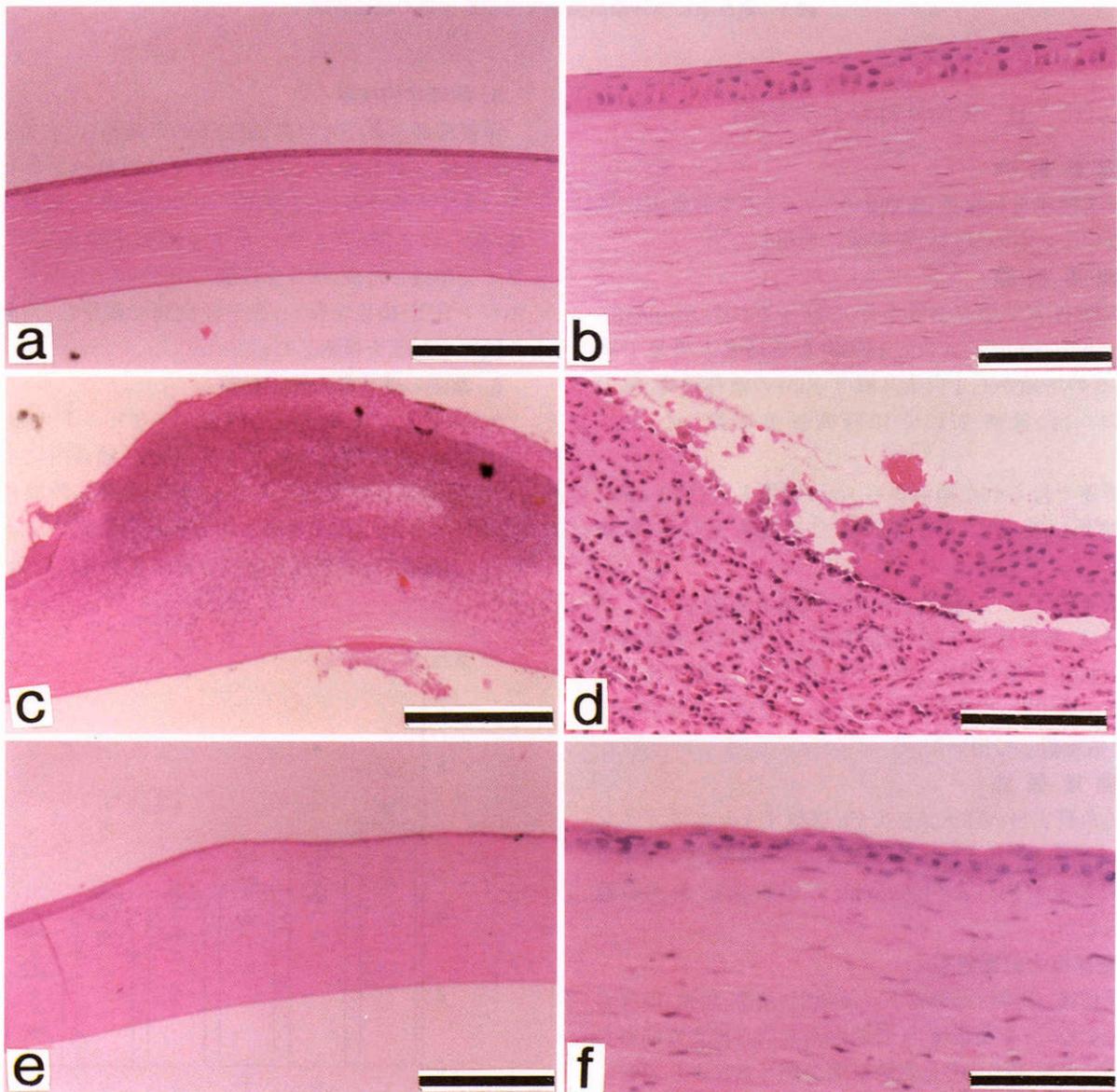


図3 表皮ぶどう球菌誘発家兎角膜感染眼の組織学的変化。

a, b: 正常角膜, c, d: 菌接種後24時間(1病日)では菌接種部位を中心に上皮欠損と上皮下の著明な線維性組織の増生および実質の膨潤がみられ、また、炎症細胞の浸潤がみられる。e, f: 接種後216時間(9病日)では2~3層の不規則な上皮細胞の再形成がみられる。a, c, eのバーは $500 \mu\text{m}$ 、b, d, fのバーは $100 \mu\text{m}$

であり, CV は 10% 以下であった(図 2).

2. 組織学的観察

正常角膜(図 3 a, b)に比べ, 菌接種後 24 時間(1 病日)(図 3 c, d)では菌接種部位を中心に上皮欠損と上皮下の著明な線維性組織の増生および実質の膨潤がみられ, また, 炎症細胞の浸潤がみられた. また, 接種後 72 時間(3 病日)においてもなお, 菌接種部位を中心に上皮欠損と著明な線維性組織の増生と隆起および実質の膨潤をみた. 接種後 216 時間(9 病日)(図 3 e, f)では 2~3 層の不規則な上皮細胞の再形成がみられ, また, 線維性組織の増生, 隆起の縮小, および実質膨潤の減少がみられ, ほぼ正常所見を呈し, 回復傾向がみられた(図 3). また, 菌液を接種したと同様の方法で角膜実質内に培養液のみ, および死菌液を接種した組織所見は正常とほぼ同様であった.

3. OFLX の房水内濃度

OFLX 点眼後の房水内への薬剤移行濃度は 3 病日および 9 病日で測定した. 感染 3 病日では $2.04 \pm 0.74 \mu\text{g}/\text{ml}$ (平均値 \pm 標準偏差)($n=7$), 9 病日では $1.01 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=7$)であった. なお, 正常眼の菌接種前の薬剤濃度は $1.06 \pm 0.23 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった(図 4). また, 培養液のみを角膜に注入した時の OFLX の眼房水内移行濃度は 3 病日で $1.07 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=6$)であり, 正常眼のものとほぼ同じであった.

IV 考 按

抗菌剤の眼内移行動態を知ることは臨床医にとり極め

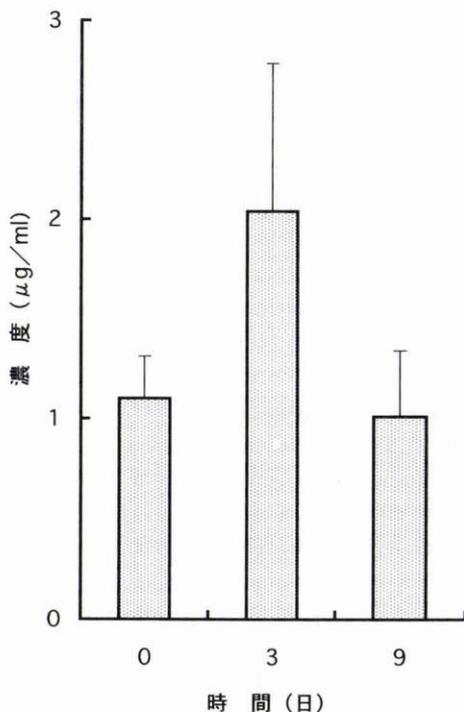


図 4 表皮ぶどう球菌誘発家兔角膜感染眼におけるオフロキサシンの房水内濃度(平均値 \pm 標準偏差値).
 $n=6\sim 7$

て重要なことであり, その情報は専ら正常動物(家兔)眼での基礎検討から得られたものである. 基本的にはこれで妥当と考えるが, 感染眼での薬剤動態は正常状態とは異なるため, 理想的には実験的に誘発された感染眼でもその薬剤動態が検討されるべきで, これまでも我々を含めて家兔, ラット, マウスを実験動物とした感染モデル作製の試みがなされてきた^{1)~4)10)}. しかし, その大部分で誘発された炎症は激症で, 臨床でみる感染症一般に相当するものではなかった. これまでの経験から, 可能な限り臨床像に近い感染モデルの作製を目指しており, 本検討に先立ちグラム陽性菌である枯草菌(*B. subtilis* ATCC 12432)で同様な検討を試みた(第 33 回日本眼感染症学会で発表). 緩やかな角膜感染症が高い再現性をもって誘発されたが, 家兔は本菌に対する抗体を有しており, 多くの実験眼で immuno-corneal ring の発現をみた¹⁵⁾(図 5). 枯草菌による炎症モデルでは細菌感染と免疫反応が混在することが多く, 感染モデルとしては不適切であると考え, 今回は起炎菌を表皮ぶどう球菌に変えて角膜感染誘発を試みた. 実験動物にはダッチ種有色家兔眼を選んだが, その理由はこれまでの我々の正常家兔眼での薬剤の眼内移行動態^{5)~9)}との比較を目的としたことにある.

外眼部感染症の誘発は接種菌, 表皮ぶどう球菌の角膜実質内注入によったが, 実験を始めるに当たり, 本モデルが表皮ぶどう球菌で誘発された感染症であることを確認する目的で, 実験眼に使用したと同様の培養液(菌を含まないもの)および死菌液(50 μl)を角膜実質内に注入したが, 正常な角膜組織所見とほぼ同様であり, これらの溶液では角膜感染所見は生じないことが確認できた. この注入操作が誘発実験のポイントと考える. 実質内にある程度の径をもって広がるように菌液を注入すればよいのであるが, これには経験が必要である. 本検討では, 菌接種 3 日目まででは 28 眼中 22 眼の家兔眼に再現性の高い

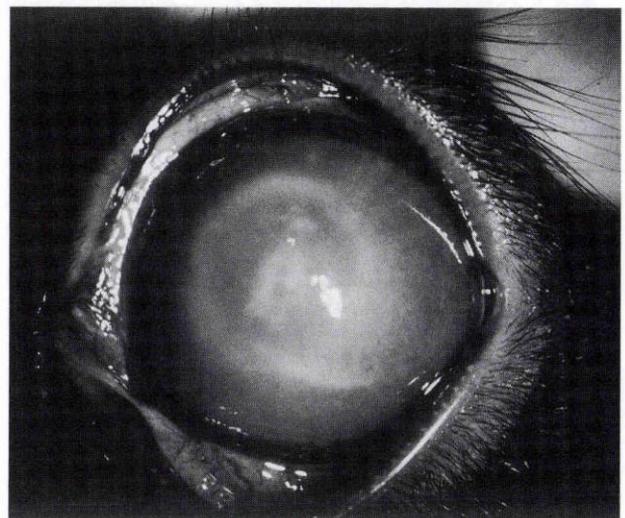


図 5 枯草菌誘発家兔角膜感染眼での immuno-corneal ring の発現.

(78.5%)角膜感染症を誘発することができた。さらに高い成功率は期待できる。誘発された感染症がこれまでのように激症でないため、今後は抗菌剤の薬効を臨床像を含めた検討に用いたい。

前述のように感染モデルの作製に当たっては、注入菌量の決定および注入方法操作が重要である。今回は注入方法として角膜実質内注入法を用いたが、これ以外に角膜実質に傷を付けた後に菌液を滴下する方法、角膜実質に予め十字に創を作った後に棉棒で菌液を塗る方法、あるいは実質内にポケットを作りそこへスパーテルで菌液を塗りつける方法などがある¹⁴⁾¹⁶⁾。再現性のあるモデルならいずれの誘発でもよいが、今回のモデル作製では確実に一定量を接種できる利点がある。比較的緩慢な角膜炎症誘発には注入菌量の調整も一つの鍵となる。

一般に、人眼における表皮ぶどう球菌による角膜炎の特徴は、境界鮮明な限局性のやや隆起した潰瘍で、周囲の角膜が比較的透明なことである¹⁷⁾。今回作製した 10^4 CFU/ml (50 μ l) モデル眼は、これらの特徴を備えているものであった。薬剤の動態実験は、角膜の症状が再現性の得られることを確認した上で開始している。

炎症の評価には Draize 法を参考にし、角膜(混濁、潰瘍)、眼球・眼瞼結膜発赤、浮腫、分泌物、虹彩発赤、前房(蓄膿、浸出物)の項目につきスコア化した。これほど高い再現性をもつモデル作製が可能なら、画像所見などを含めてさらに新しい角度からの病変評価ができるものと考えられる。改めて検討してみたい。

炎症惹起に今回と同じ菌を用いた検討が既にある¹¹⁾。その眼症状は各眼で異なっていたとしているが、このばらつきの原因の一つとして、角膜実質内への菌接種法の手技的な問題に加えて、菌の発育状態の相違があったものと考えられるが、総じて今回のモデルより炎症の程度が高い。各眼で再現性のある所見が得られない限り、データの比較を目的とする実験モデルとはいえない。

確立した感染誘発モデルができれば、その後は感染眼での薬理作用の評価にこれが用いられてよい。感染眼では眼内の正常バリア機構が破壊されるため、薬剤の動態は正常眼のそれとは異なる。多くの場合、正常の倍量の薬剤濃度が眼内に移行すると推定されるが、今回の0.3% OFLX 点眼の実験は、正常眼(対照)、菌接種 74 Hrs (3 病日)、216 hrs (9 病日)の感染眼を用いて、薬剤房水中移行濃度を点眼後1時間に設定したが、これはこれまでの著者らの OFLX の成績では正常眼で点眼後1時間に房水内最高濃度値(AQCmax)があることを確認していることが一つの理由である。今回は、この1時間時点で正常眼と感染眼の房水内移行濃度を実際に評価しようという意図で行ったものである。

正常時の移行濃度に比べ、約2倍の濃度の薬剤が前房水から検出されている。前回の枯草菌モデルでも、0.3% OFLX、0.3% ノフロキサシン点眼剤を今回と同じ条件下

で投与し、その房水内移行動態を測定した。OFLX で正常の約12倍、ノフロキサシンで約8倍の移行濃度差があることを確認している(第33回日本眼感染症学会で発表)。これに比べ、本モデルでの OFLX の房水内移行値は約2倍と非感染眼での濃度と大きな差はなかった。この差の原因の一つとして、角膜損傷程度の差は無視できない。広範な角膜上皮欠損を特徴とする枯草菌(*B. subtilis* ATCC 12432)感染症での薬剤の房水内移行の方が限局した角膜潰瘍を呈し、正常な上皮細胞を比較的広範囲に持つ表皮ぶどう球菌による角膜感染症に比べ移行濃度値は高かった。本モデルの角膜組織所見により、角膜上皮細胞がフルオロキノロン系抗菌剤の房水内移行に大きく影響することが明らかになった。感染眼に投与される薬剤も、眼組織内での該当する原因菌の最小発育阻止濃度(MIC)を十分上回っているなら、その薬効は期待できると考える。正常眼での薬剤動態を知ることは今後も必要であるが、この種の感染眼での検討もこれからは必要と考える。

文 献

- 1) 栗山 裕, 鯨島昭吾, 守先真由美, 木下貴一: ウサギ緑膿菌および表皮ぶどう球菌角膜感染症に対する Lomefloxacin 点眼液の効果. 眼 44: 434-444, 1993.
- 2) 秦野 寛: 緑膿菌性眼内炎の実験的研究—前房内接種における菌株と病原性について—. 日眼会誌 86: 129-135, 1982.
- 3) 田中直彦, 佐々木隆敏, 宮地誠二, 大関尚志, 土屋雅彦: マウスにおける緑膿菌性角膜感染症に関する実験的研究. 第1報 菌株の角膜に対する病原性についての予備実験. 日眼会誌 76: 28-31, 1972.
- 4) 佐藤田鶴子, 吉田 誠, 安部 葵, 石垣佳希, 宮坂孝弘, 足立雅利: 新キノロン系抗菌剤 fleroxacin のウサギ感染モデルにおける組織移行に関する研究. 日化療会誌 43: 903-906, 1995.
- 5) Kernacki KA, Fridman R, Hazlett LD, Lande MA, Berk RS: *In vivo* characterization of host and bacterial protease expression during pseudomonas aeruginosa corneal infections in naive and immunized mice. *Curr Eye Res* 16: 289-297, 1997.
- 6) Hobden JA, Masinick SA, Barrett RP, Hazlett LD: Aged mice fail to upregulate ICAM-1 after Pseudomonas aeruginosa corneal infection. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 36: 1107-1114, 1995.
- 7) O'Brien TP, Sawusch MR, Dick JD, Gottsch JD: Topical ciprofloxacin treatment of pseudomonas keratitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 106: 1444-1446, 1988.
- 8) Fukuda M, Sasaki K: Intraocular dynamic mode differences of new quinolone antibacterial agents between pigmented and albino rabbit eyes. *Lens Eye Toxic Res* 6: 339-351, 1989.

- 9) 福田正道, 佐々木一之: Ofloxacin 点眼液の眼組織内移行動態の検討. 眼紀 37: 823—828, 1986.
- 10) Fukuda M, Sasaki K: Different iris coloration and uptake of a fluoroquinolone agent into the iris ciliary body of rabbit eyes. Ophthalmic Res 26: 137—140, 1993.
- 11) Fukuda M, Sasaki K: Changes in the antibacterial activity of melanin-bound drugs. Ophthalmic Res 22: 123—127, 1990.
- 12) 富井隆夫, 福田正道, 中泉裕子, 佐々木一之, 葉田野博: ソフトコンタクトレンズ併用による抗生剤の眼内移行 2. 有効濃度維持のための検討. 眼紀 32: 210—2112, 1981.
- 13) Draize JH: Appraisal of safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics by the stuff of the division of pharmacology food and drug administration, department of health education and welfare, by FDA officials of US. Business Office Topeka, Kansa 48—52, 1959.
- 14) 石橋康久: Fusarium による実験的角膜真菌症—接種法および実験動物による違いについて—. 眼紀 28: 521—531, 1977.
- 15) 佐々木一之: 蛍光標識法による眼部抗原抗体反応の追跡. 臨床病理 17: 550—555, 1969.
- 16) 石橋康久: Fusarium による実験的角膜真菌症—接種法の改良ならびに実験動物の再検討—. 日眼会誌 82: 643—651, 1978.
- 17) 松本光希: 眼感染症治療戦略. 8. 細菌角膜炎. 眼科診療プラクティス. 21. 文光堂, 東京, 124—135, 1996.