

ビタミン A 欠乏食飼育家兎に対するビタミン A パルミテートの点眼効果

久保 慶和, 有村 秋子, 渡部 保男, 中安 清夫, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：ビタミン A (VA) 欠乏動物を作製し、欠乏による前眼部症状に対するビタミン A パルミテート (VA pal) の点眼効果を検討した。

方 法：生後 3 週間の幼若家兎を VA 欠乏飼料で飼育し、血中レチノール量の変化と前眼部症状について観察した。VA 欠乏症状を示した個体に対し、VA pal 水性点眼剤を投与した。

結 果：VA 欠乏飼料による飼育開始 7 か月目から血中レチノールが低下し、10 か月目に表層角膜炎の発生および結膜杯細胞の消失を確認した。VA 欠乏により惹起

された前眼部症状は、VA pal 水性点眼剤投与 3 週間で肉眼的に正常な状態に回復し、顕微鏡観察においても杯細胞が再生した。また、血中レチノール量も回復した。

結 論：VA 欠乏ウサギにおいて点眼投与での VA pal の有効性が推定された。(日眼会誌 103: 729—733, 1999)

キーワード：ビタミン A 欠乏, ウサギ, 杯細胞, 表層角膜炎, 点眼剤

Effect of Vitamin A Palmitate on Vitamin A-deficient Rabbits

Yoshikazu Kubo, Akiko Arimura, Yasuo Watanabe, Kiyoo Nakayasu and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose : We examined the effects of vitamin A palmitate (VA pal) eyedrops on the symptoms caused by vitamin A-deficiency in rabbits.

Methods : Three-week-old rabbits were raised on a vitamin A-deficient diet, and were examined for the quantity of retinol in the serum and the condition of the anterior segment of the eye. The vitamin A-deficient animals were treated with VA pal eyedrops.

Results : The retinol in the serum began to decrease seven months after the animals were placed on the vitamin A-deficient diet. After ten months, superficial punctate keratitis and the loss of conjunc-

tival goblet cells were observed. Treatment of the disease in the anterior segment of the eyes with VA pal eyedrops resulted in restoration of normal condition within 3 weeks. The treatment increased the goblet cells in the ocular conjunctiva and the retinol in the serum.

Conclusions : These results show the efficacy of topical VA pal treatment for vitamin A-deficient rabbits. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 729—733, 1999)

Key words : Vitamin A-deficient, Rabbit, Goblet cell, Superficial punctate keratitis, Eyedrop

I 緒 言

ビタミン A (VA) は脂溶性で、体内ではレチノールとして存在し、血流中でレチノール結合タンパクに結合して末梢まで運ばれる。眼組織では涙腺へと運ばれ、レチノールの形で涙液中に分泌されるとともに、一部はエステル化されて涙腺内に貯蔵される¹⁾²⁾。VA が欠乏すると

肝臓に次いで血中の VA 量が減少し、成長停止を起こすなどの全身症状とともに、角結膜にいくつもの顕著な異常が観察される。角膜における初期の症状は涙液分泌減少および点状表層角膜炎であり、進行すれば角膜上皮びらん、角膜潰瘍、そして角膜穿孔となる。また、結膜においては、杯細胞の数が著しく低下する。これらの症状は VA 投与により回復する^{1)3)~5)}。VA の眼科領域における臨床

別刷請求先：113-8431 東京都文京区本郷 3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 中安 清夫
(平成 10 年 11 月 30 日受付, 平成 11 年 5 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

(Received November 30, 1998 and accepted in revised form May 26, 1999)

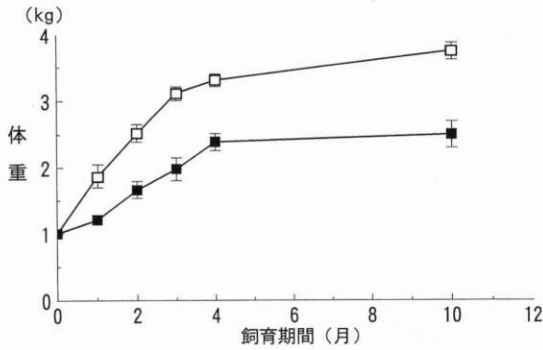


図1 普通食およびビタミンA(VA)欠乏食飼育ウサギの体重変化。
□：普通食 ■：VA 欠乏食(ただし、表層角膜炎が発生した個体)

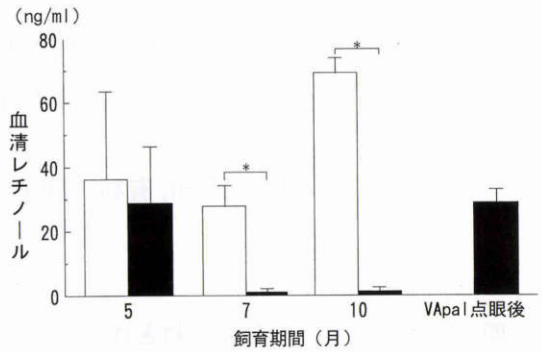


図2 血清中のレチノール濃度変化。
□：普通食 ■：VA 欠乏食(ただし、表層角膜炎が発生した個体) *: p<0.05(t-test)

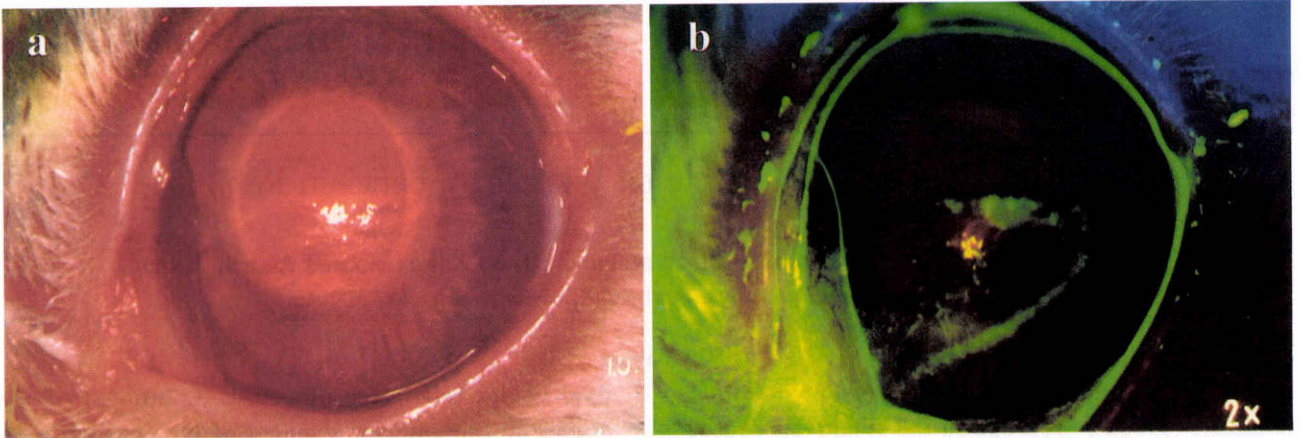


図3 VA 欠乏食飼育 10 か月目の肉眼所見(表層角膜炎が発生した個体).

a：無染色 b：フルオレセイン染色

中央から下方にかけて楕円に表層角膜炎がみられる(a). その部分に一致して、フルオレセイン染色は陽性であり、特に、境界部の染色がはっきりしている(b).

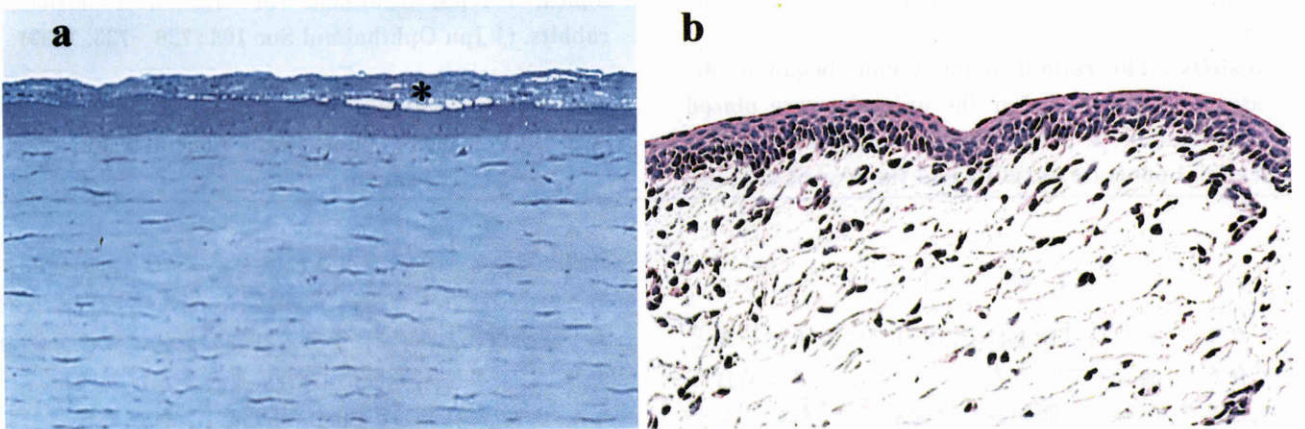


図4 VA 欠乏食飼育 10 か月目の光学顕微鏡所見(表層角膜炎が発生した個体).

a：フルオレセイン染色陽性部分の角膜(トルイジンブルー染色)/角膜上皮が剥離している(*).

b：眼瞼結膜[過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色]/杯細胞はない.

応用の可能性としては、角化性角結膜上皮疾患や上輪部角結膜炎、涙液分泌減少による角結膜炎などに対する治療薬として、さらには角結膜の創傷治癒を促進する薬剤

として期待されている。最近では、従来からの眼軟膏や油性点眼剤の他に、水性点眼剤の開発や合成レチノイドの臨床応用も行われている^{6)~10)}。

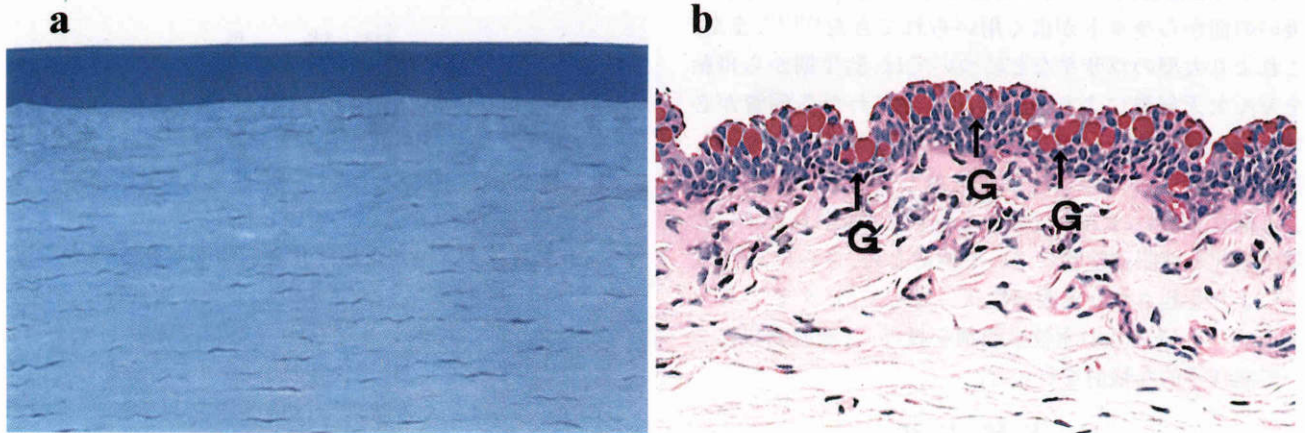


図 5 普通食飼育の光学顕微鏡所見.
a: 角膜(トルイジンブルー染色)/角膜上皮剥離はない.
b: 眼瞼結膜(PAS 染色)/杯細胞が多数存在する(G).

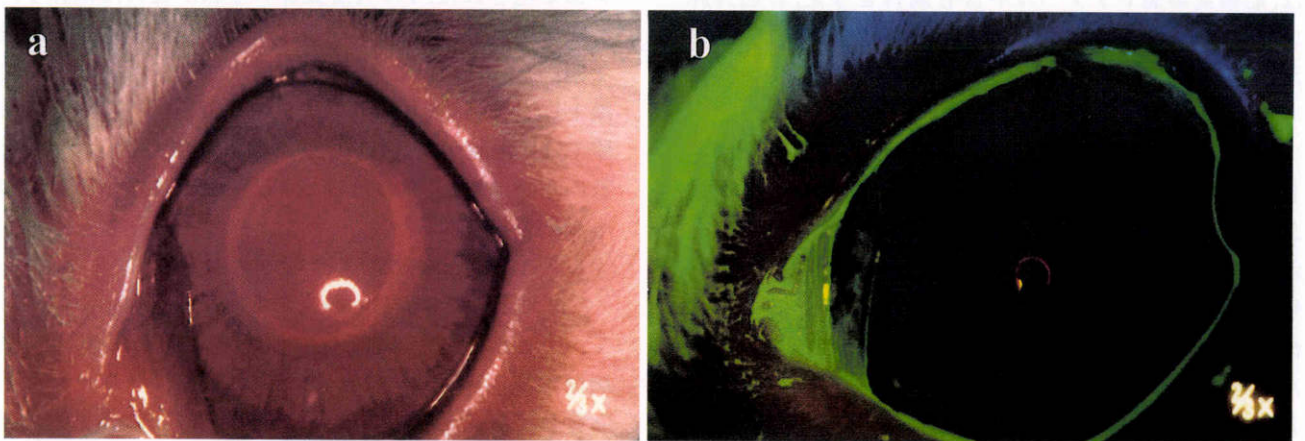


図 6 ビタミン A パルミテート(VA pal)点眼後 3 週間目の肉眼所見.
a: 無染色 b: フルオレセイン染色
表層角膜炎はみられず,フルオレセイン染色も陰性である.

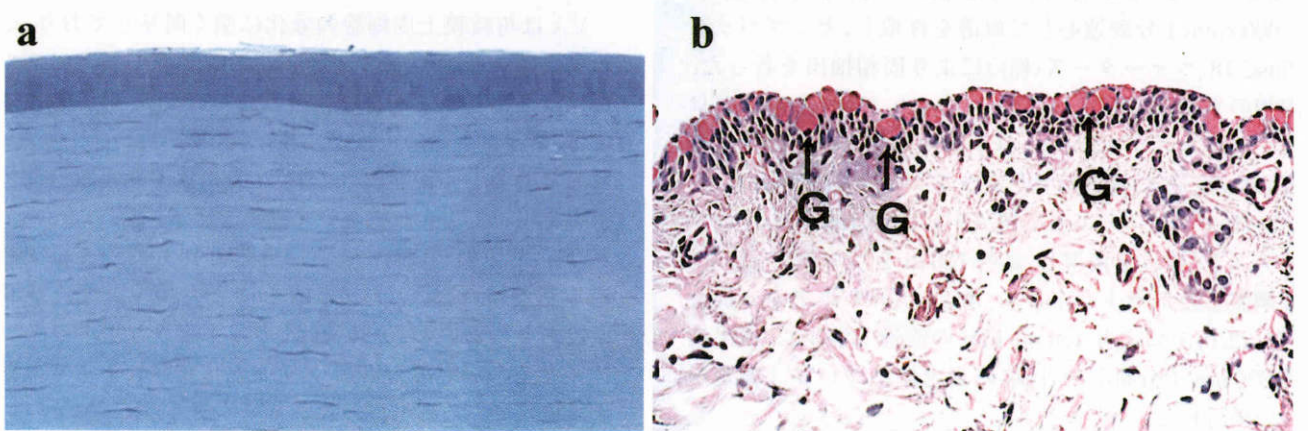


図 7 VA pal 点眼後 3 週間目の光学顕微鏡所見.
a: 角膜(トルイジンブルー染色)/角膜上皮剥離は修復されつつある.
b: 眼瞼結膜(PAS 染色)/杯細胞が多数存在する(G).

VA 欠乏動物についての研究は、大きさやコスト、取り扱いの面からラットが広く用いられてきた¹¹⁾¹²⁾。また、これより大型のウサギなどについては、胎生期から母胎を VA 欠乏飼料により飼育して二代にわたる飼育が必要となり、飼育期間の長期化などの問題があった。今回、我々は生後3週間の幼若家兎に対して VA 欠乏飼料による飼育を行い、VA 欠乏家兎を作製し、血中レチノール量の変化と前眼部症状について検討した。さらに、VA 欠乏により惹起された前眼部症状に対して、ビタミン A パルミテート (VA pal) 水性点眼剤を投与し、その効果について病理学的な検討を行った。

II 実験方法

1. 実験材料

生後3週、体重約 1.0 kg の日本白色種雄家兎を日本 SLC (株) から購入して使用した。VA 欠乏食群 (n=5) には、船橋農場製レチノール不含有飼料を与え、普通食群 (n=4) には、ラボ R ストック [日本農産工 (株)] を与えた。

2. 観察

飼育開始後 1, 2, 3, 4, 10 か月目に各個体の体重を測定した。また、1, 3, 5, 7, 10 か月目に前眼部を肉眼的に観察およびフルオレセインで染色して観察した。欠乏症状を示した家兎の組織学的観察を行うため、10 か月目に過剰量のチオペンタールナトリウムで安楽死 (n=1) させた後、眼球を摘出し、角膜および眼瞼結膜について 2.5% グルタル溶液で固定した。パラフィン包埋し、マイクロームで 3~5 μm の切片として、角膜はトルイジンブルー染色、結膜は過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を行い、光学顕微鏡観察を実施した。また、普通食群の 1 匹についても同様に組織学的に観察し、両群を比較した。

3. 血清レチノールの定量

5, 7 および 10 か月目に耳静脈から 2~3 ml 採血し、3,000 rpm, 1 分間遠心して血清を採取し、セップバック PlusC 18 [ウォーターズ (株)] により固相抽出を行った。固相の平衡化は常法に従って行い、0.1% ブチルヒドロキシトルエン/アセトニトリル溶液で抽出した液を試料とした。定量は、高速液体クロマトグラフィを用いた。カラムは、コスモシール 5C 18 AR [φ 4.6×150 mm, ナカライテスク (株)] を使用し、試料 100 μl をリン酸で pH 6.8 に調整したアセトニトリル/水/トリエチルアミン混液 (78/22/0.5) により 1.0 ml/min の流速で溶出し、検出波長 326 nm で分析した。両群の測定値について、t 検定を行い検討した。

4. VA pal 水性点眼剤の投与

千寿製薬 (株) から供与された VA pal 水性点眼剤 (1,000 IU/ml) を用いた。飼育開始 10 か月後に角結膜に VA 欠乏症状があった家兎 (n=2) に対して、1 日 4 回、各 25 μl を 3 週間連続して投与した。投与後、血中レチノール量、

前眼部の肉眼的および組織学的観察を行った。

III 結果

1. 体重変化

VA 欠乏食群は普通食群に比べ生育が悪く、体重の増加も緩やかであった (図 1)。また、VA 欠乏食群の 1 匹は、飼育開始約 2 か月後に死亡した。

2. 血清レチノール濃度変化と前眼部所見

血清レチノール濃度は、5 か月まで普通食群と VA 欠乏食群の間で大きな差はなかったが、7 か月目から VA 欠乏食群で低下し、普通食群の 1/20 以下の濃度となった (図 2)。しかし、この時点では前眼部に異常な所見はなかった。飼育 10 か月経過時点で、VA 欠乏食群 4 匹中 3 匹で角膜表面が粗造構造となり、表層角膜炎が発生した。その程度は、図 3 に示すように、角膜の中央から下方にかけて病変部がみられ、その部分に一致してフルオレセインに染色された。VA 欠乏食群の症状が現れた個体 1 匹を安楽死させ、角膜および眼瞼結膜について光学顕微鏡で観察を行ったところ、表層角膜炎がみられた部位で角膜上皮層の剝離 (トルイジンブルー染色) が確認され、結膜では杯細胞が消失 (PAS 染色) していた (図 4)。なお、比較のため、普通食群の角膜および眼瞼結膜の光学顕微鏡写真を図 5 に示す。

3. VA pal 点眼効果

VA 欠乏により表層角膜炎があった家兎 (n=2) に対して、VA pal 水性点眼剤を投与した。肉眼的な観察では、点眼開始後 3 週間で角膜表面状態は改善し、フルオレセイン染色でも染色部分はなくなった (図 7)。血清レチノール濃度は、28.8 ng/ml まで回復した (図 2)、光学顕微鏡観察においても角膜の剝離は修復されつつあり、眼瞼結膜では杯細胞が多数存在した (図 8)。

IV 考察

VA は角結膜上皮細胞の分化に深く関与しており、その欠乏は角結膜上皮に異常をもたらす。VA 欠乏モデル動物は従来ラットが多く使用されているが、眼科学領域では、薬物点眼量の正確さ、観察のしやすさなどの点から家兎でのモデルが望まれており、我々は生後3週間の幼若家兎を用いて VA 欠乏モデル動物を作製した。

今回、VA 欠乏飼料による飼育開始 10 か月目で前眼部に症状が現れた。ラットでは 2~3 か月で VA 欠乏症状がみられるといわれているが、ラットとウサギのライフサイクルの差を考えると、モデルが作製されるまでの期間は妥当であると推察される。VA 欠乏症状については、表層角膜炎が発生し、光学顕微鏡観察でも角膜表面の剝離と結膜杯細胞の消失が確認された。結膜の杯細胞は、ステーブンス-ジョンソン症候群や眼類天疱症などの角結膜癬痕性疾患あるいはアルカリや酸による化学腐食の症例など様々な原因により消失することが知られてい

る。VA の欠乏でも分化異常から杯細胞が消失し、分泌されるムチンが低下して涙液層が不安定となり、乾燥症状を示すことが報告¹³⁾されている。今回のモデルはこれらの報告と一致する結果であり、角結膜障害のモデルとして使用可能と考えられた。

表層角膜炎が発症した動物を用い、VA の点眼効果を検討した。VA 欠乏により惹起された前眼部症状は、VA pal 水性点眼剤の投与により 3 週間で肉眼的には正常な角膜の状態に回復した。光学顕微鏡観察においても、消失していた杯細胞が正常な結膜とほぼ同程度観察された。VA pal 点眼により杯細胞への分化が正常な状態となり、杯細胞からのムチンが十分に分泌されて症状の回復につながったと考えられる。また、VA pal 点眼後の血中レチノール濃度は、普通食群と差がなかった 5 か月の時点まで回復し、VA 欠乏モデルにおいて、点眼により VA が血中に移行することが確認された。非 VA 欠乏動物における VA pal 点眼後の眼内動態について、角結膜内に良好に分布・滞留することが知られている¹⁴⁾が、今後、VA 欠乏動物の症状回復に寄与した VA の供給ルートを検討する必要があると考える。

稿を終えるに当たり、製剤を提供していただきました千寿製薬(株)に謝意を表します。

文 献

- 1) 渡辺 潔：ビタミン A 欠乏症と角膜。あたらしい眼科 6:1627—1633, 1989.
- 2) Ubels JL, MacRae SM: Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits. *Curr Eye Res* 3: 815—822, 1984.
- 3) 雨宮次生：眼科とビタミン。臨床と研究 73: 2267—2270, 1996.
- 4) Sommer A, Sugana T: Corneal xerophthalmia and keratomalacia. *Arch Ophthalmol* 100: 404—411,

- 1982.
- 5) Sommer A, Green WR: Goblet cell response to vitamin A treatment for corneal xerophthalmia. *Am J Ophthalmol* 94: 213—215, 1982.
- 6) Tseng SCG, Maumenee AE, Stark WJ, Maumenee IH, Jensen AD, Green WR, et al: Topical retinoid treatment for various dry-eye disorders. *Ophthalmology* 92: 717—727, 1985.
- 7) Tseng SCG: Topical tretinoin treatment for severe dry-eye disorders. *J Am Acad Dermatol* 15: 860—866, 1986.
- 8) Soong HK, Martin NF, Wagoner MD, Alfonso E, Mandelbaum SH, Laibson PR, et al: Topical retinoid therapy for squamous metaplasia of various ocular surface disorders. *Ophthalmology* 95: 1442—1445, 1988.
- 9) Wright P: Topical retinoic acid therapy for disorders of the outer eye. *Trans Ophthalmol Soc UK* 104: 869—873, 1985.
- 10) Ohashi Y, Watanabe H, Kinoshita S, Hosotani H, Umemoto M, Manabe R: Vitamin A eyedrops for superior limbic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 105: 523—527, 1988.
- 11) Hassell JR, Newsome DA, Luca LMD: Increased biosynthesis of specific glycoconjugates in rat corneal epithelium following treatment with vitamin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 642—647, 1980.
- 12) Hassell JR, Newsome DA: Vitamin A-induced alterations in corneal and conjunctival epithelial glycoprotein biosynthesis. *Ann NY Acad Sci* 359: 358—365, 1981.
- 13) 林 研：涙腺、マイボーム腺、ゴブレット細胞の働きとその異常。日コレ誌 36: 16—20, 1994.
- 14) Horiuchi T: Metabolic fate of instilled retinyl palmitate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 803, 1996.