

# 新しい角膜保存液の開発

## —第 2 報 ヒト角膜での検討—

立花 敦子<sup>1)</sup>, 澤 充<sup>1)</sup>, David G Hwang<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部眼科学教室

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, University of California, San Francisco

### 要 約

**目 的**：単純な組成による強角膜片保存液を開発し、その有用性についてヒト角膜を用いて形態学的検討を行った。

**対象と方法**：検討した組成液は、minimum essential medium を基本溶液とし、2.5%コンドロイチン硫酸(分子量 27,500)を含む pH 7.33、浸透圧 320 mOsm/kg の溶液(保存液-I)で、対照は OPTISOL-GS<sup>®</sup>とした。ヒト角膜は Eye Bank Eye (Lions Eye Bank of Oregon, 米国)を使用した。強角膜片作製後、1 眼を OPTISOL-GS<sup>®</sup>、他眼を保存液-I に 4°C で保存し、5, 10, 14 日目の強角膜片内皮細胞を走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡で観察した。

**結 果**：ヒト角膜では、両保存液とも保存期間が長くなるにつれて細胞内小器官の変性が出現する傾向にあったが、OPTISOL-GS<sup>®</sup>と保存液-I で内皮細胞の形態には差がなかった。

**結 論**：保存液-I は、OPTISOL-GS<sup>®</sup>と同程度の角膜内皮細胞の保存が可能であると考えられた。以上のことから、単純な組成から成る保存液でも、ヒト角膜内皮細胞の viability が維持される可能性が推定された。

(日眼会誌 105 : 295—300, 2001)

**キーワード**：角膜保存液、角膜内皮細胞、コンドロイチン硫酸、OPTISOL-GS<sup>®</sup>、強角膜片保存

## Development of Corneal Storage Medium

### —Second Report. Examination of Human Cornea—

Atsuko Tachibana<sup>1)</sup>, Mitsuru Sawa<sup>1)</sup> and David G Hwang<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, University of California, San Francisco

### Abstract

**Purpose** : To develop and evaluate by histological methods a new corneal storage medium with a simple formula.

**Methods** : We compared a corneal storage medium which contained minimum essential medium and 2.5% chondroitin sulfate (molecular weight 27,500), pH 7.33, osmolality 320 mOsm/kg with OPTISOL-GS<sup>®</sup>. Paired human donor eyes provided by the Lions Eye Bank of Oregon were stored in a moist chamber until the experiment. A cornea with scleral rim was excised and stored in OPTISOL-GS<sup>®</sup>, and its fellow cornea was stored in the test medium for 5, 10, or 14 days at 4°C. Histological examination of corneal endothelial cells was done by both scanning electron microscopy and transmission electron microscopy.

**Results** : On days 5 and 10, there was no significant difference in histological findings between corneas stored in OPTISOL-GS<sup>®</sup> and those in the

test medium. Both corneal groups developed degenerative changes with the increase of storage time, but their histological findings were similar for both storage media. On day 14, corneal endothelial cells showed marked degeneration of intracellular organelles such as a swelling of mitochondria in both media.

**Conclusion** : Human corneas stored in the test medium for 14 days maintained their structure as well as those in OPTISOL-GS<sup>®</sup>. This shows that the newly developed corneal storage medium composed can be used for medium-term corneal storage. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 295—300, 2001)

**Key words** : Corneal storage medium, Corneal endothelial cell, Chondroitin sulfate, Storage of cornea with scleral rim, OPTISOL-GS<sup>®</sup>

別刷請求先：173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 立花 敦子  
(平成 12 年 5 月 22 日受付, 平成 12 年 10 月 20 日改訂受理)

Reprint requests to: Atsuko Tachibana, M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received May 22, 2000 and accepted in revised from October 20, 2000)

## I 緒 言

我々は第1報<sup>1)</sup>で簡単な組成による2種類の強角膜片保存液(保存液-Iと保存液-II)を開発し、その有用性に

ついて家兎角膜を用いてOPTISOL-GS<sup>®</sup>との比較検討を行った。保存液-Iと保存液-IIは、組織培養液であるminimum essential medium(以下、MEM)を基本溶液とし、2.5%コンドロイチン硫酸を含むpH 7.33、浸透圧

表 1 OPTISOL-GS<sup>®</sup>と今回調整した保存液の組成

	OPTISOL-GS <sup>®</sup>	保存液-I	保存液-II
基本溶液	MEM, TC-199	MEM	MEM
緩衝液	HEPES	HEPES	HEPES
抗生剤	ゲンタマイシン ストレプトマイシン	ゲンタマイシン (100 mg/L)	ゲンタマイシン (100 mg/L)
コンドロイチン硫酸 (分子量)	2.5% (27,500)	2.5% (27,500)	2.5% (33,700)
デキストラン	1.0%	—	—
ATP	アデノシン, イノシン アデニン	—	—
ビタミン	B <sub>12</sub> , アスコルビン酸, $\alpha$ -トコフェロール	$\alpha$ -トコフェロール	$\alpha$ -トコフェロール
その他	鉄, コレステロールなど	—	—
pH	7.25	7.33	7.33
浸透圧(mOsm/kg)	351	320	320

HEPES : N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, MEM : minimum essential medium

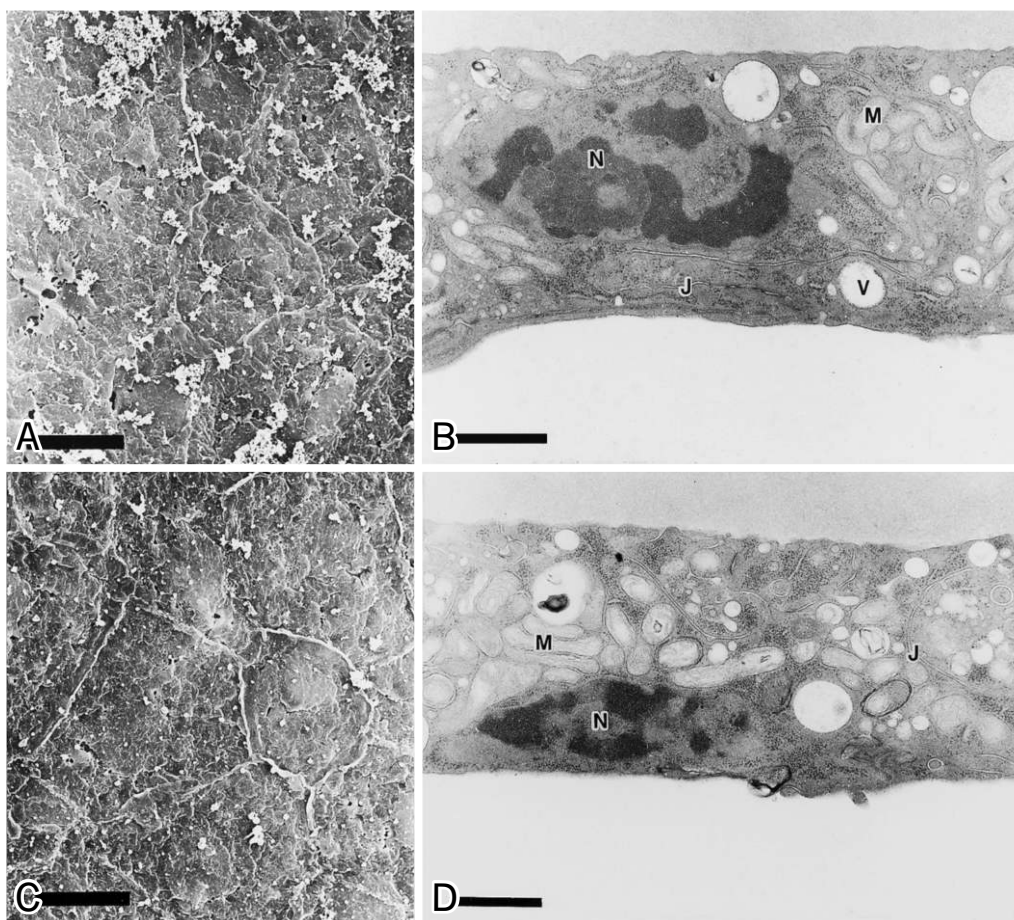


図 1 保存 5 日目のヒト角膜内皮細胞

A : OPTISOL-GS<sup>®</sup>, B : OPTISOL-GS<sup>®</sup>, C : 保存液-I の走査電子顕微鏡(SEM)では、細胞境界は明瞭である。  
D : 保存液-I の透過電子顕微鏡(TEM)では、細胞内小器官は比較的良好に保たれている。A, C は SEM でバーは 10  $\mu$ m,  
B, D は TEM でバーは 1  $\mu$ m。

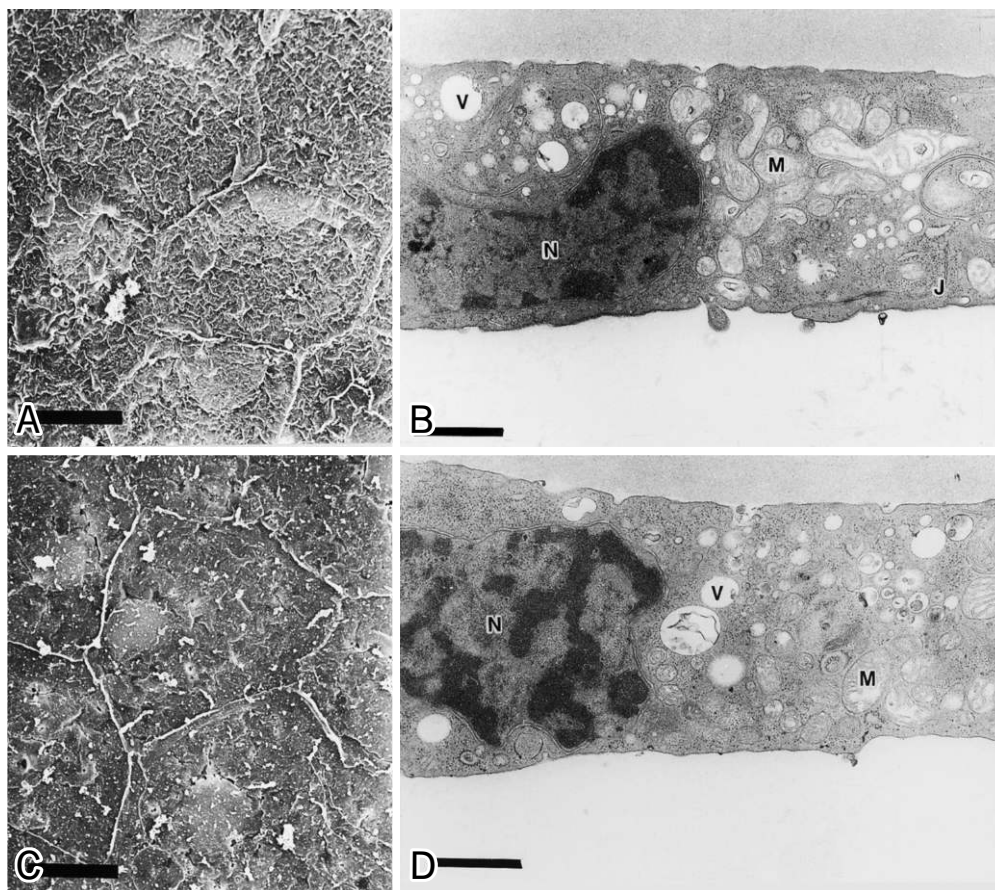


図 2 保存 10 日目のヒト角膜内皮細胞

A : OPTISOL-GS<sup>®</sup>, B : OPTISOL-GS<sup>®</sup>, C : 保存液-I の SEM では, 両者に明らかな差はない。  
D : 保存液-I の TEM では, ミトコンドリアの膨化およびミトコンドリア内のクリステの崩壊がある。

320 mOsm/kg の溶液で, その違いは使用したコンドロイチン硫酸の分子量と供給源のみである。家兎角膜での保存実験の結果, 保存液-I は保存 14 日目までは OPTISOL-GS<sup>®</sup> と同程度の保存能を有し, 保存液-II に比べ優れていることが推定された。そこで今回, 我々はヒト角膜を用いて保存液-I の有用性について, OPTISOL-GS<sup>®</sup> との比較検討を形態学的に行った。

## II 保存液の調製

表 1 に示すような保存液-I について, OPTISOL-GS<sup>®</sup> (Chiron Ophthalmics, Inc, Irvine, Calif) との比較検討を行った。

実験室で調製した保存液-I をクリーンベンチ内においてフィルタで濾過しながら乾熱滅菌(180°C, 3 時間)したガラス瓶に 20 ml ずつ充填し, 70%エタノールで拭いた後, 紫外線照射(片面 30 分ずつ)したパッキンを装着したキャップ(キャップはオートクレーブ滅菌, 121°C で 20 分)で蓋し, 4°C で保存した。

## III 実験方法

Lions Eye Bank of Oregon から提供された eye bank

eye(平均 74.8 歳)24 眼を使用した。University of California San Francisco(UCSF)で保存実験後, 固定した強角膜片の組織学的検討を日本大学眼科学教室で行った。Moist chamber 内に保存(平均 2.2±1.2 日間, 平均値±標準偏差)された全眼球から強角膜片を作製し, 右眼を OPTISOL-GS<sup>®</sup>, 左眼を保存液-I に入れ, 各 4 眼ずつ 4°C で 5, 10, 14 日間保存した。各期間保存後の強角膜片を 2.5%グルタルアルデヒドで固定後半割し, 一片をアルコール系列で脱水後, 臨界点乾燥(HCP-2 CRITICAL PORT DRYER, 日立), 金蒸着(Quick Auto Coater, サンヨー電子)し, 走査電子顕微鏡(以下, SEM)(S-650, 日立)で観察を行った。もう一片は 1%四酸化オスミウムで二重固定した後, アルコール系列で脱水, エポキシ樹脂で包埋した。超薄切片作製後, ウラニールアセテートおよびクエン酸鉛による二重染色を施し, 透過電子顕微鏡(以下, TEM)(JEOL 1200 EX, 日本電子)で観察を行った。

## IV 結果

5 日目: OPTISOL-GS<sup>®</sup> と保存液-I の SEM では, 内皮細胞表面は粗であるが, 境界は明瞭である(図 1 A,

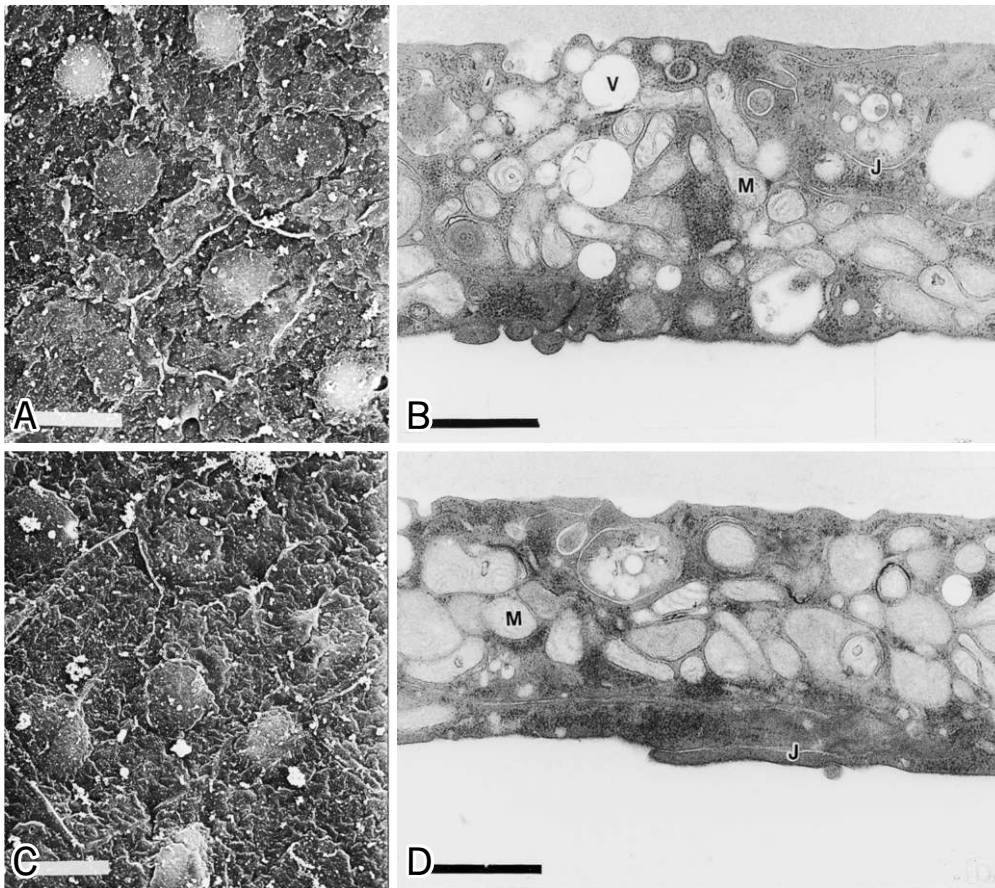


図3 保存14日目のヒト角膜内皮細胞。

A: OPTISOL-GS®, B: OPTISOL-GS®, C: 保存液-I の SEM では、両者に明らかな差はない。  
D: 保存液-I の TEM では、ミトコンドリアの膨化が著明で、空胞化が目立つが、細胞間隙は狭く保たれている。

C). TEM では内皮細胞内に小空胞があるが、細胞内小器官は比較的保たれている(図1 B, D)。

10 日目: 両保存液とも、内皮細胞表面はひび割れたようになっているが、細胞境界は明瞭である(図2 A, C)。細胞内はミトコンドリアの膨化や小空胞が目立ってきている(図2 B, D)。

14 日目: 両保存液ともに、内皮細胞表面の変化はかなり強くなり、細胞質の脱水のため核が細胞表面に観察されるようになってきている(図3 A, C)。ミトコンドリアの膨化や空胞の増加、ミトコンドリア内クリステの破壊など細胞内小器官の変性も著明であるが、細胞間隙は狭く保たれており、両保存液間に明らかな差はない(図3 B, D)。以上から、各期間において OPTISOL-GS® と保存液-I は同程度の保存状態を呈していた。また、各期間とも多少の個体差はあるが、4 眼はほぼ同様の所見を呈していた。

## V 考 按

我々は第1報で、家兎角膜の保存実験を行い報告<sup>1)</sup>した。2種類の保存液(保存液-I と保存液-II)について OPTISOL-GS® との形態学的な比較検討を行った結果、

保存液-I と保存液-II は保存7日目までは OPTISOL-GS® とほぼ同様の保存状態を呈していたが、保存14日目になると保存液-II での保存状態が他の2つに比べ明らかに劣っていた。この結果を踏まえ、今回の実験ではヒト角膜を用いて保存液-I と OPTISOL-GS® との比較検討を行った。

ヒト角膜の保存実験では、眼球摘出時の角膜の詳細は不明であるが、同一者の眼球であれば左右でほぼ同じ状態を呈していると推察できることから、同じ保存期間については同一者の角膜を使用した。各保存期間において OPTISOL-GS® と保存液-I は形態学的に明らかな差はなかった。両者とも特に SEM で全体的に内皮細胞表面が粗雑であったが、これは moist chamber 内に平均2.2日間保存されていたことが影響していると考えられる。Moist chamber 内では全眼球保存であり、死後変性した前房水により内皮細胞がダメージを受けやすいためである<sup>2)3)</sup>。

保存液の組成を考える上で基本となることは、低温(4°C)における一定の代謝レベルを維持し、代謝に伴う角膜組織の変化(角膜実質の膨化など)を最小限に食い止めることである。低温(4°C)の状態でも、角膜は37°Cの時

表 2 これまでに報告された各保存液の組成

組成	EP	EP-II	M-K®	K-Sol®	DexSol®	OPTISOL-GS®
基本溶液	TC-199	GPR	TC-199	TC-199 Earle's BSS	MEM	TC-199, MEM Earle's BSS
緩衝液		リン酸系	重炭酸イオン	HEPES	HEPES	HEPES
抗生物質	使用時に加える	使用時に加える	ストレプトマイシン ペニシリン	ゲンタマイシン	ゲンタマイシン	ストレプトマイシン ゲンタマイシン
コンドロイチン硫酸	+			2.5%	1.35%	2.5%
デキストラン		+	5%		1%	1%
その他	イノシン アデニン アデノシン	グルコース				イノシン アデニン アデノシン Fe, Vitamins, cholesterol, L-hydroxyproline
pH	7.6	7.35	7.4	7.455	7.48	7.25
浸透圧(mOsm/kg)	320	305	290	310	309	351

澤 充：コンパクト眼科学 角膜・結膜疾患，金原出版，東京，122，1996 から引用改変。  
GPR：glutathion phosphate ringer

の 1/20 程度ではあるが乳酸を合成する<sup>4)</sup>とされている。よって、保存液の基本溶液には TC-199 や MEM などの組織培養液が用いられ、角膜実質の膨化抑制のためにデキストランやコンドロイチン硫酸などの膠質が含まれている。あとはその組み合わせや、濃度、その他の物質が含まれるか否かの差である。表 2 にこれまでに報告された保存液の組成を示す。

1974 年に McCarey-Kaufman(M-K) medium<sup>®</sup> が報告<sup>5)</sup>されてから、保存液はその組成を少しずつ変化させながら現在の OPTISOL-GS<sup>®</sup> にたどりついた。OPTISOL-GS<sup>®</sup> は、K-Sol<sup>® 6)~13)</sup> と DexSol<sup>® 14)15)</sup> の長所を組み合わせて作られたといわれている<sup>16)~18)</sup> が、その特徴は複雑な組成にある。特にアデノシン 3 リン酸(ATP)の前駆物質(アデノシン、イノシン、アデニン)やビタミン B<sub>12</sub>、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールなどが含まれている点である。ATP の前駆物質は 4°C でも十分に解糖系を進め、ATP を供給することができるといわれている<sup>19)20)</sup>。ビタミン B<sub>12</sub> は酵素反応に欠かせない要素として<sup>21)</sup>、また、アスコルビン酸と  $\alpha$ -トコフェロールは抗酸化作用があるといわれている<sup>22)</sup>。これらの物質が含まれたことと、コンドロイチン硫酸の濃度が高くなったことにより、OPTISOL-GS<sup>®</sup> は DexSol<sup>®</sup> に比べて、保存期間中の角膜厚は薄く、内皮細胞の viability も良好であるが、角膜移植術 1 年後の臨床データ(内皮細胞数の減少など)では差はないとの報告<sup>23)</sup>もある。以上のことから、保存液の組成は必要最小限のものを含有していれば良いのではないかと考えられる。今回我々が調製した保存液は、基本に基づいた非常にシンプルな組成である。今回は角膜厚の測定や内皮細胞の viability の評価などについては検討していないが、前回の家兎角膜および今回のヒト角膜の保存実験の結果から、形態学的には

OPTISOL-GS<sup>®</sup> とほぼ同等の保存能を有する可能性が推定された。今後は定量的な確認や移植実験などを行い、臨床応用に向けて検討していく必要があると考えている。

稿を終えるに当たり、UCSF での実験にご協力いただきました征矢耕一先生(現在、東京大学医学部眼科学教室)、岩田光浩先生(日本大学医学部眼科学教室)ならびに保存液の調整について参天製薬奈良眼科研究所のご協力に深謝いたします。

本研究は文部省科学研究費、日本眼球銀行、読売光と愛の事業団の研究助成を受けた。

文 献

- 1) 立花敦子, 澤 充：新しい角膜保存液の開発—第 1 報家兎角膜での検討—。日眼会誌 105：3—12, 2001.
- 2) Bito LZ, Salvador EV：Intraocular fluid dynamics. II. Postmortem changes in solute concentration. Exp Eye Res 10：273—287, 1970.
- 3) Hull DS, Green K, Bowman K, Csukas S, Riley MV：Intracellular pH and glutathione levels in rabbit corneal endothelium following storage in moist chamber and MK medium. Invest Ophthalmol Vis Sci 24：214—217, 1983.
- 4) Meyers KR, Graham MV, Hodson S：The effects of exogenous bicarbonate on the rabbit cornea undergoing prolonged refrigerated storage. Exp Eye Res 26：555—560, 1978.
- 5) McCarey BE, Kaufman HE：Improved corneal storage. Invest Ophthalmol 13：165—173, 1974.
- 6) Kaufman HE, Varnell ED, Kaufman S：Chondroitin sulfate in a new corneal preservation medium. Am J Ophthalmol 98：112—114, 1984.
- 7) Kaufman HE, Varnell ED, Kaufman S, Beuerman RW, Barron BA：K-Sol corneal preserva-

- tion. *Am J Ophthalmol* 100 : 299—304, 1985.
- 8) **Yan C, Kaufman HE** : A medium-term corneal preserving medium (K-Sol). *Arch Ophthalmol* 104 : 598—601, 1986.
  - 9) **Busin M, Yan C, Avni I, Kaufman H** : Comparison of K-Sol and M-K medium for cornea storage : Results of penetrating keratoplasty in rabbits. *Br J Ophthalmol* 70 : 860—863, 1986.
  - 10) **Stein RM, Bourne WM, Campbell RJ** : Chondroitin sulfate for corneal preservation. *Arch Ophthalmol* 104 : 1358—1361, 1986.
  - 11) **Stein RM, Laibson PR** : Comparison of chondroitin sulfate to McCarey-Kaufman medium for corneal storage. *Am J Ophthalmol* 104 : 490—493, 1987.
  - 12) **Farge EJ, Fort RA, Wilhelmus KR** : Morphologic changes of K-Sol preserved human corneas. *Cornea* 8 : 159—169, 1990.
  - 13) **Keates RH, Rabin B** : Extending corneal storage with 2.5% chondroitin sulfate(K-Sol). *Ophthalmic Surg* 19 : 817—820, 1988.
  - 14) **Lindstrom RL** : Advances in corneal preservation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 88 : 555—648, 1990.
  - 15) **Lass JH, Musch DC, Gordon JF, Laing RA** : Epidermal growth factor and insulin use in corneal preservation : Results of a multi-center trial. The Corneal Preservation Study Group. *Ophthalmology* 101 : 352—359, 1994.
  - 16) **Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED** : Optisol corneal storage medium. *Arch Ophthalmol* 109 : 864—868, 1991.
  - 17) **Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA, Lass JH, Musch DC, et al** : Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 114 : 345—356, 1992.
  - 18) **Lass JH, Bourne WM, Musch DC, Sugar A, Gordon JF, Reinhart WJ, et al** : A randomized, prospective, double-masked clinical trial of Optisol vs Dexsol corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 110 : 1404—1408, 1992.
  - 19) **森末禎一, 高橋時子** : イノシン, アデノシン, アデニンの角膜代謝におよぼす影響について. *日眼会誌* 70 : 1044—1047, 1966.
  - 20) **Martin DW** : Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides. In : Mayes PA, et al(Eds) : *Harper's review of biochemistry*. 20 th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, Calif, 357—376, 1985.
  - 21) **Lehninger AL** : Vitamins and coenzymes. In : Lehninger AL(Ed) : *Biochemistry*. 2nd ed. Worth Publishers Inc, New York, NY, 335—360, 1975.
  - 22) **Chow CK** : Factors affecting antioxidant defense potential. In : Carpel ID(Ed) : *Cellular antioxidant defense mechanisms*. CRC Press Inc, Boca Raton, Fla, 191—216, 1988.
  - 23) **Lass JH, Bourne WM, Musch DC, Sugar A, Gordon JF, Reinhart WJ, et al** : A randomized, prospective, double-masked clinical trial of Optisol vs DexSol corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 110 : 1404—1408, 1992.
-