

## 家兎角膜アルカリ外傷眼に対する結膜移植術の組織学的検討

高浦 典子<sup>1)</sup>, 稲田 紀子<sup>2)</sup>, 庄司 純<sup>2)</sup>, 澤 充<sup>2)</sup><sup>1)</sup>新座・志木中央総合病院眼科, <sup>2)</sup>日本大学医学部眼科学教室

## 要 約

**目的:** 受傷後早期のアルカリ外傷眼に対する結膜移植術の奏効機序について, 組織学的検討を行った。

**方法:** 1 N 水酸化ナトリウム水溶液で白色家兎の片眼にアルカリ外傷眼モデルを作製後, 移植群と移植しない非移植群とに分け, 経時的, 組織学的に観察した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン染色と, 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色, 抗上皮ケラチン抗体 (AE 5) を用いた蛍光間接抗体法で染色し, 一部は透過電子顕微鏡で観察した。

**結果:** 移植群では移植結膜と強膜との接着部に癒痕組織の形成が観察され, 移植後 20 日目, 8 週目には輪部上皮下の新生血管・浸潤細胞は移植後 10 日目と比較して減少していた。非移植群では, 8 週目には輪部付近の浸潤細胞は 20 日目と比較して低下したが, 癒痕組織は形成されず, アルカリ外傷部位の角膜上に血管と厚い

結合織を伴った結膜が侵入していた。蛍光顕微鏡所見では, 受傷部の上皮に AE 5 陽性細胞はなかった。透過電子顕微鏡所見では移植群の移植結膜上皮基底膜の凹凸は軽度で, 癒痕組織内に萎縮した線維芽細胞が多数存在した。非移植群では, 結膜上皮の基底膜には波状の凹凸があり, 結膜下組織内に多数の線維芽細胞が観察された。

**結論:** 移植群では移植結膜下に癒痕組織が形成されることにより, 上強膜の血管からの細胞浸潤や, 角膜への血管侵入, 結膜侵入を抑制し, 輪部構造の再構築を速やかに進行させることが推定された。(日眼会誌 105: 591-596, 2001)

**キーワード:** アルカリ外傷眼, 結膜移植, 癒痕組織, 線維芽細胞, 結膜上皮基底膜

## Histological Study of the Effect of Conjunctival Transplantation on Rabbit Cornea with Alkali Burned

Noriko Takaura<sup>1)</sup>, Noriko Inada<sup>2)</sup>, Jun Shoji<sup>2)</sup> and Mitsuru Sawa<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department Ophthalmology, Niiza Shiki General Hospital<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

## Abstract

**Purpose:** A histopathological study to investigate the efficacy of conjunctival auto-transplantation on alkaline chemical burns of the ocular surface.

**Material and Methods:** An alkaline chemical burn model was developed in one eye of rabbits using 0.1 N NaOH solution. In one group conjunctival transplantation was performed. A control group did not receive conjunctival transplantation. A histological follow-up study was performed by light microscopy with hematoxylin eosin stain and periodic acid Schiff staining by fluoro-microscopy using epithelial Keratin-AE 5 antibody, and by transmission electron microscopy (TEM).

**Results:** The transplanted group showed scar formation between the transplanted conjunctival tissue and the sclera. At 20 days and 8 weeks after the transplantation, neovascularization and cell infiltration in the subepithelium of the limbus was decreased compared with the transplanted group at 10 days. The control group showed a decrease of cell infiltration in the limbal area compared with the

group at 10 days, but conjunctival tissue with thick collagenous tissue and neovascularization instead of scar tissue developed on the injured cornea. AE 5 positive cells were not found in the limbus in either group. In the transplanted group, in TEM, the basement membrane of transplanted conjunctiva showed less irregularity, and degenerated fibroblasts were present at the margin of the scar tissue. In the control group, the basement membrane of the conjunctiva showed an irregular pattern and fibroblasts beneath the conjunctival epithelium had large nuclei.

**Conclusion:** In the transplanted group, scar tissue developed and suppressed cell infiltration, neovascularization, and conjunctival tissue in the injured cornea and secured re-structuring of the limbal tissue. (J Jpn Ophthalmol Soc 105: 591-596, 2001)

**Key words:** Alkali burned cornea, Conjunctival transplantation, Basement membrane of the conjunctiva, Fibroblast, Scar tissue

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 高浦 典子  
(平成 12 年 10 月 17 日受付, 平成 13 年 3 月 9 日改訂受理)

Reprint requests to: Noriko Takaura, M. D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine,  
30-1 Oyaguchi-kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received October 17, 2000 and accepted in revised form March 9, 2001)

## I 緒 言

アルカリ外傷眼は、直接的な角膜上皮障害に加え、組織融解、変性による組織障害から角膜への結膜侵入、眼内組織障害を惹き起こす可能性がある。また、眼内組織障害から続発性の緑内障を惹き起こす場合もあり、難治性の疾患である。重症のアルカリ外傷では、瘢痕期に対して角膜上の結膜上皮増殖を改善するために外科的治療法として、keratoepithelioplasty(以下、KEP)<sup>1)</sup>や、羊膜移植術<sup>2)</sup>、IV型コラーゲンによる輪部形成術<sup>3)</sup>など様々な治療法が行われているが、確立された方法はない。また、片眼性のアルカリ外傷眼に対しては、上皮修復の促進を目的として受傷後早期の自己結膜移植術が有効であると報告<sup>4)</sup>されているが、その奏効機序についても必ずしも明らかではない。今回、我々は家兎アルカリ外傷眼モデルを作製し、受傷後早期のアルカリ外傷眼に対する結膜移植術の有効性について、組織学的検討を行った。

## II 実験方法

実験動物には、白色家兎(体重 2.5~3.0 kg)の雄 16 匹 16 眼を使用した。

### 1. アルカリ外傷眼の作製

ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール<sup>®</sup>)の耳静脈麻酔下で、1 N 水酸化ナトリウム溶液(NaOH)に浸した濾紙(直径 6 mm) 3 枚を片眼角膜輪部に 3 分間留置した(図 1)。除去後、直ちに 50 ml の生理食塩水で洗浄し、塩酸オキシテトラサイクリン(テラマイシン眼軟膏<sup>®</sup>)を点入した。

### 2. 結膜移植術

アルカリ外傷作製後、2 週間目に病巣部の結膜を切除し、健眼から採取した健常結膜(約 10×10 mm)を 9-0 Dexon 糸(9-0 DEXON<sup>®</sup> “S” Davis-Geck)で病巣部に縫着し移植群とした。また、アルカリ外傷作製後、未処置のまま経過観察を行ったものを非移植群とした(図 1)。

### 3. 前眼部の観察

移植群と非移植群は経時的にアルカリ外傷部の角膜、移植結膜を観察し、MEDICALNIKKOR(NIKON)を装着した一眼レフカメラで前眼部写真撮影を行った。

### 4. 組織学的検討

移植群を基準として移植後 10、20 日目、8 週目に経時的、組織学的検討を行った。白色家兎にネンブタール<sup>®</sup>を静脈内過剰投与して屠殺し、眼球摘出を行った。摘出した眼球は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、細切後上昇エタノール系列で脱水した。テクノビット<sup>®</sup> 7100 (Heraeus)で包埋後薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE 染色)、periodic acid Schiff 染色(以下、PAS 染色)により光学顕微鏡(Olympus BH 21)で観察した。

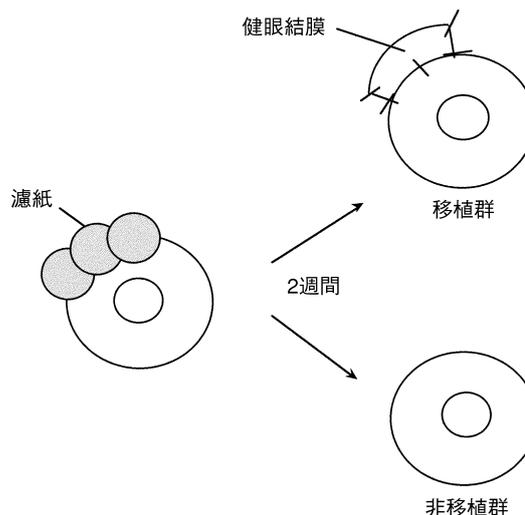


図 1 実験方法。

結膜移植 8 週後の試料の一部は、2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定後細切し、1% オスミウム酸で後固定した。続いて上昇エタノール系列で脱水後エポキシ樹脂(エポン 812<sup>®</sup>, 応研商事)で包埋し、超薄切片を作製した。酢酸ウラン染色とクエン酸鉛染色の二重染色を行い、透過電子顕微鏡(JEOL-1200 EX, 日本電子)で観察した。

健常眼の強角膜片と移植後 10、20 日目の強角膜片の一部は 2% periodate lysine paraformaldehyde (PLP) 溶液で固定後、ドライアイス-イソペンタンで OCT compound (Tissue Tec<sup>®</sup>, さくら精機)に凍結包埋し、約 7 μm の薄切切片を作製した。凍結切片作製後、切片を正常血清添加リン酸緩衝生理食塩水(PBS)と 30 分間室温で反応させ、非特異的吸着を防止した。血清抗ヒト上皮ケラチンマウス抗体(以下、AE 5)を切片に添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で十分に洗浄した後、希釈した二次抗体(FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体, DAKO 社)を切片に添加し、室温で 30 分間反応させ、落射型蛍光顕微鏡(BX 60, OLYMPUS)で観察した。陰性対照として、AE 5 の代わりに PBS を用いて同様の観察を行った。

## III 結 果

### 1. 前眼部観察

移植群では、20 日目ごろから移植結膜片内に新生血管が観察された。8 週後には移植した結膜片は収縮していたが、角膜は透明で血管の侵入はなかった(図 2)。

非移植群では、20 日目に角膜の血管侵入と角膜混濁が観察され、8 週後にも同様にみられた(図 3)。

### 2. 光学顕微鏡観察

#### 1) 移植後 10 日

HE 染色：移植群では、移植片内や移植片が接着している上強膜血管周囲に、好中球および単核球を主体とす

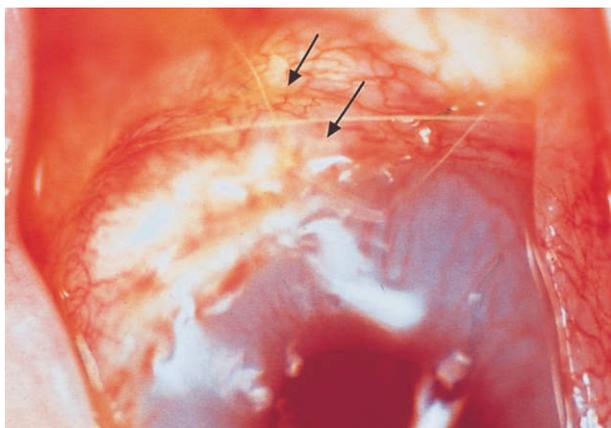


図 2 移植 8 週目の移植群の前眼部所見。  
8 週間には移植した結膜片(矢印)は収縮したが、角膜は透明で血管の侵入もなかった。

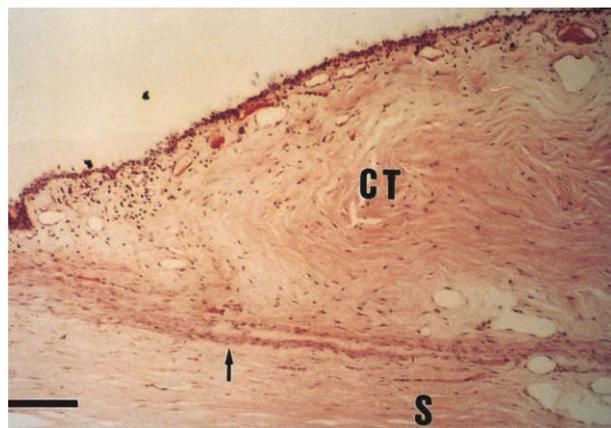


図 4 移植 20 日目の移植結膜組織所見(HE 染色)。  
移植片(CT)と強膜(S)との境界部に瘢痕組織(矢印)が形成されている。HE：ヘマトキシリン・エオジン。  
バーは 40 μm

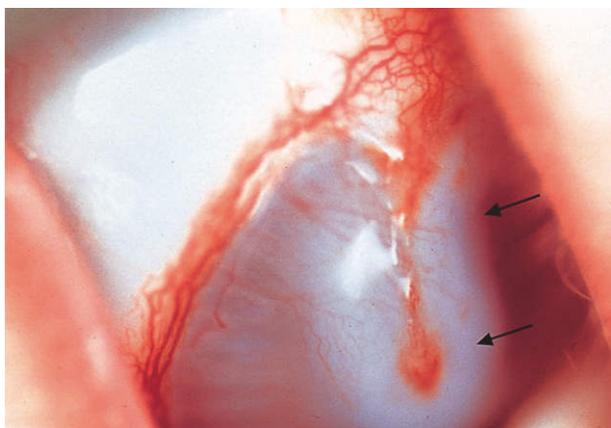


図 3 移植 8 週目の非移植群の前眼部所見。  
非移植群では、角膜の血管侵入と角膜混濁(矢印)が残存していた。

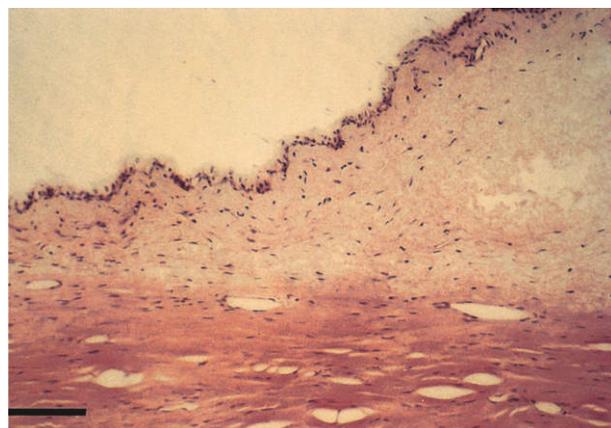


図 5 移植 20 日目の非移植群の病巣結膜輪部組織所見(HE 染色)。  
結膜下に無構造な壊死組織があり、炎症細胞浸潤も依然として多数あった。バーは 40 μm

る浸潤細胞が多数存在した。アルカリ外傷受傷部位の角膜は、上皮が一部欠損し、実質内に多数の浸潤細胞が観察された。

非移植群では、アルカリ外傷受傷部の結膜下から上強膜にかけて、好中球および単核球を主体とする浸潤細胞が多数存在した。また、アルカリ外傷受傷部位の角膜は上皮欠損と実質内には多数の血管侵入があり、侵入血管の周囲には好中球、単核球を主体とする浸潤細胞が観察された。移植群と非移植群との間で角膜実質内の細胞浸潤所見に差はなかった。

PAS 染色：両群とも、受傷部輪部付近には PAS 陽性細胞はなかった。

蛍光抗体法：両群とも、受傷部輪部付近の上皮に AE 5 陽性細胞はなかった。

2) 移植後 20 日

HE 染色：移植群では、移植片の上皮に欠損はなく、上皮は角膜との接合部で角膜上皮に移行していた。移植

片の上皮組織内には多数の血管と浸潤細胞が存在し、壊死組織はなかった。また、移植片と強膜との境界部には薄い瘢痕組織が形成され、瘢痕組織が形成された部位にある血管周囲の浸潤細胞は、移植後 10 日目と比較して減少していた(図 4)。アルカリ外傷受傷部位の角膜実質内の細胞浸潤も減少していた。

非移植群では、アルカリ外傷受傷部位の結膜下組織に相当する部位に無構造な壊死組織があり、その上を周囲から伸展した結膜組織が覆っていた。周囲の結膜下組織には細胞浸潤が多数あり、角膜実質内の血管侵入と細胞浸潤は移植後 10 日目の非移植群と比較して低下していた(図 5)。

PAS 染色：移植群、非移植群ともにアルカリ外傷受傷部位を覆う上皮内に、PAS 染色陽性の細胞が観察されたが、非移植群では移植群と比較して PAS 陽性細胞が多数あった。

蛍光抗体法：両群とも、受傷部の上皮に AE 5 陽性所

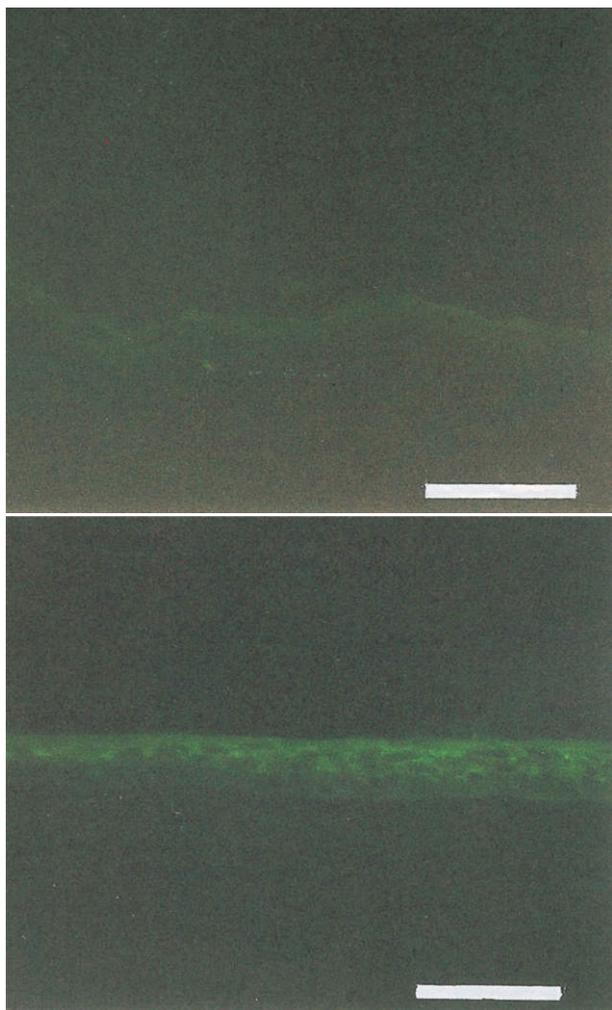


図 6 上段は移植 20 日目の移植群輪部付近の蛍光抗体法染色像。下段は陽性対照。

受傷部輪部付近の上皮に陽性細胞はなかった。  
バーは 20  $\mu\text{m}$

見はなかった(図 6)。

### 3) 移植後 8 週

HE 染色：移植群では、アルカリ外傷受傷部位の上皮が重層化し、角膜に血管および結合織を伴った結膜の侵入は観察されず、角膜実質の層構造も均一であった(図 7)。移植片の厚さは薄くなり、移植後 20 日目と同様に癒痕組織によって強膜に接着していた。移植片周囲の結膜下組織には浸潤細胞はほとんどなかった。

非移植群では、アルカリ外傷受傷部位の上皮には 2~3 層の層構造が形成され、角膜上に血管と厚い結合織を伴った結膜が侵入していたが、輪部付近の結膜下から上強膜にかけての細胞浸潤は減少していた。また、アルカリ外傷受傷部位の角膜実質の層構造は乱れているが、細胞浸潤は減少していた(図 8)。

PAS 染色：移植群では、角膜上および移植結膜片上に PAS 陽性細胞はなかった(図 9)のに対して、非移植群では角膜上に伸展した結膜上皮内に PAS 陽性細胞が観察された(図 10)。

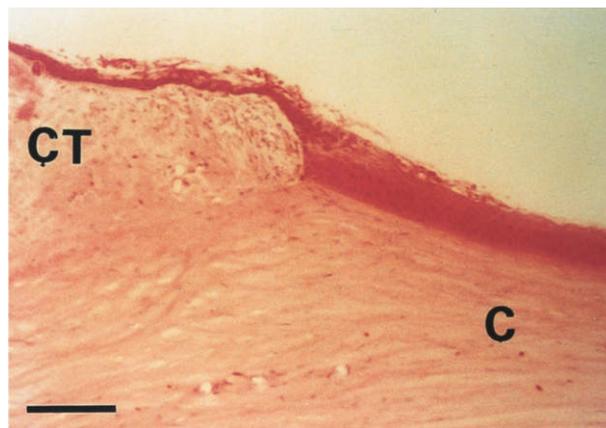


図 7 移植 8 週目の移植群の移植結膜組織所見(HE 染色)。

移植片(CT)は強膜に接着しており、角膜(C)には血管および結合織の侵入はほとんどなかった。また、輪部角膜上皮には、重層化があった。バーは 20  $\mu\text{m}$

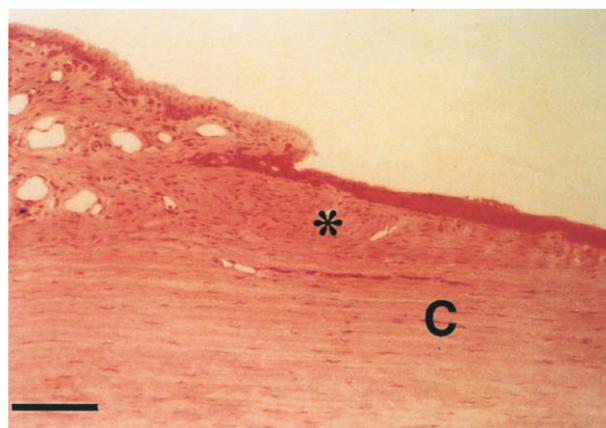


図 8 移植 8 週目の非移植群の病巣結膜輪部組織所見(HE 染色)。

輪部角膜実質(C)の層構造が乱れ、実質上は血管および厚い結合織を伴った結膜組織(\*)が侵入していた。  
バーは 20  $\mu\text{m}$

## 2. 透過電子顕微鏡所見

移植後 8 週目の移植群では、主に移植結膜上皮を中心に観察した。基底細胞は、広い細胞間隙と、電子密度の低い細胞質を持ち、ヘミデスモゾームで基底膜と接着していた(図 11)。基底膜は凹凸が少なく平坦であった。移植結膜上皮下の線維芽細胞は、細胞質内の電子密度が低く、密に並んだ膠原線維の束の間で扁平に変形し、長い細胞質の突起を伸ばしていた。

非移植群では、角膜上に侵入した結膜を中心に検討した。結膜上皮の基底細胞は、細胞質内に電子密度の高いフィラメント様物質があった。また、基底膜には波状の凹凸があり、基底細胞とヘミデスモゾームで接着していた(図 12)。また、結膜下組織の膠原線維は疎であり、多数の線維芽細胞が観察できた。移植群と比較して線維芽細胞の細胞質は電子密度が高く、大きな核を持ってい

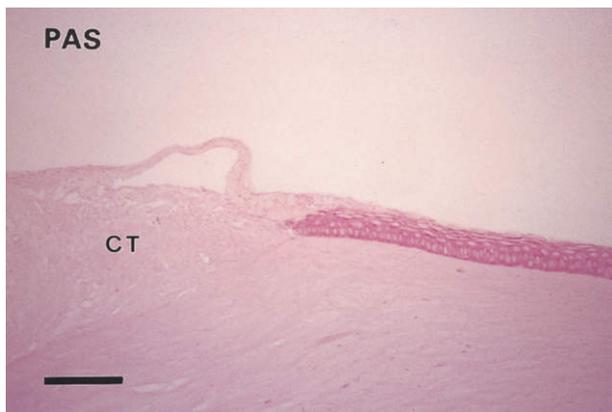


図 9 移植 8 週目の移植結膜組織所見(PAS 染色).  
角膜上および移植結膜片上に PAS 陽性細胞はなかつた. PAS: 過ヨウ素酸シッフ染色. バーは 20  $\mu\text{m}$

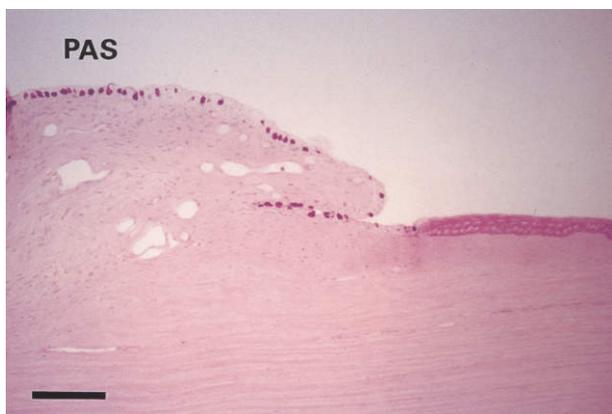


図 10 移植 8 週目の非移植群の病巣結膜輪部組織所見(PAS 染色).  
角膜上に伸展した結膜上皮内に PAS 陽性細胞があった. バーは 20  $\mu\text{m}$

た.

#### IV 考 按

アルカリ外傷は、直接的な角結膜障害に加え、組織融解、壊死による組織障害から角膜への結膜侵入、角膜実質内の炎症の遷延化を惹き起こし、高度の視力障害を生じるとされている。このようなアルカリ外傷眼に対する治療法としては、障害が軽度の場合は薬物治療が主体であるが、結膜侵入を伴った高度な視力障害例では外科的治療が必要とされる。外科的治療法としては、1977 年 Thoft<sup>1)</sup>により片眼のアルカリ外傷眼に対する自己結膜移植術が、簡便で拒絶反応のない有効な治療であるとして報告されている。一方、自己結膜移植以外に、keratoepithelioplasty<sup>2)</sup>や羊膜移植術<sup>3)</sup>などの方法が有効であったとの報告もある。しかし、これらの手術時期、手術方法の選択およびその奏効機序に関しては、不明な点も多い。今回、受傷後早期に行う自己結膜移植術の奏効機序を明らかにする目的で、家兎アルカリ外傷眼に自己

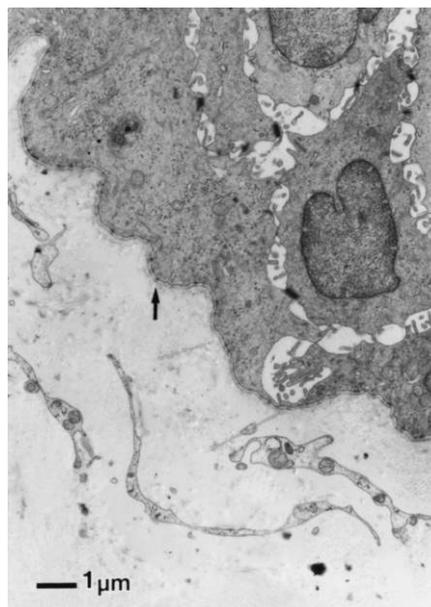


図 11 移植 8 週目の移植群の移植結膜上皮下, 透過電子顕微鏡所見.  
基底膜の凹凸は減少し, 基底細胞と基底膜はヘミデスマゾームで接着していた(矢印). バーは 1  $\mu\text{m}$

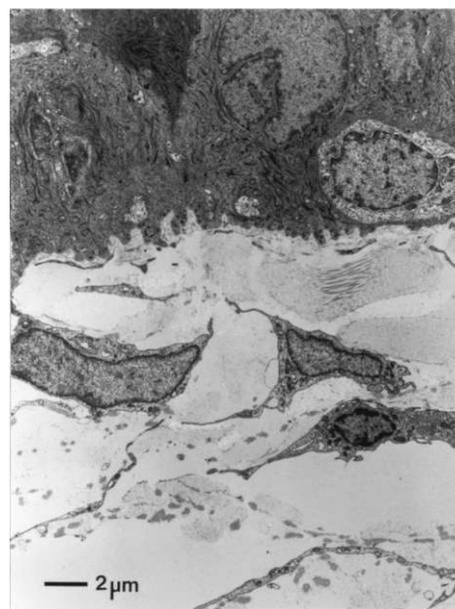


図 12 移植 8 週目の非移植群の結膜上皮下, 透過電子顕微鏡所見.  
基底膜に波上の凹凸があり, 基底細胞の細胞質内には density の高いフィラメント様物質が充満していた. バーは 2  $\mu\text{m}$

結膜移植術を施行し、結膜移植後の創傷治癒過程を組織学的に検討した。

今回の実験では、非移植群において、角膜への結膜侵入が組織学的に観察された。一方、移植群では、移植片と強膜の間に層状の癒痕組織が形成され、移植片が強膜と強固に癒着する所見が得られたが、これが移植群での

組織学的特徴の一つであると考えられた。また、瘢痕組織の形成が明瞭となる移植後 20 日以降では、移植片と強膜との接着面にあった血管周囲の炎症細胞が減少し、角膜上への結膜侵入が抑制されていた。今回、結膜移植により細胞浸潤および結膜侵入が抑制された機序を考える上では、KEP で検討されている奏効機序が参考になると考えられる。木下ら<sup>4)</sup>は KEP において、lenticle の Bowman 膜が結膜侵入を抑制するとし、lenticle の代わりに IV 型コラーゲンをを用いて KEP を行った結果、同様の臨床効果が得られたことを報告している。また、齋藤ら<sup>5)</sup>は瘢痕期のアルカリ外傷眼に対する KEP 後の混濁例の組織を免疫組織化学的に検討し、lenticle の Bowman 膜は、拒絶反応や炎症反応に関与する CD 8, CD 4, UCHL-1 陽性 T 細胞の浸潤を阻止する効果があると述べている。これに対して、天野ら<sup>6)</sup>はラットを使った KEP モデルにおいて、lenticle の存在が上皮と血管との間に距離を置くことになり、lenticle の上皮が血流のない環境下に置かれ、血管侵入が抑制されると述べている。

これらの報告と今回の結果とを考え合わせると、結膜移植では、一連の創傷治癒過程でできた上皮下瘢痕組織が強膜と密着することにより、角膜と結膜との間に物理的なバリアが形成され、角膜への血管侵入や炎症細胞浸潤が抑制されたと考えられ、瘢痕組織が KEP における lenticle の Bowman 膜と同等もしくはそれ以上の効果を発揮した可能性が考えられた。

上皮の修復過程についての透過電子顕微鏡所見では、非移植群では輪部結膜上皮基底膜に波状の凹凸があり、また基底細胞の細胞質の電子密度が高いことから、球結膜上皮の基底細胞と同様の構造<sup>7)</sup>であると考えられた。また、PAS 染色による光学顕微鏡観察で、goblet 細胞の存在が観察できた。一方、移植群の移植結膜の上皮細胞は、細胞質の電子密度が低く、基底膜は非移植群と比較して平坦であり、明らかに非移植群とは異なる構造を呈した。光学顕微鏡による観察では、移植後 8 週目ですでに移植結膜片上に goblet 細胞はなかった。Schermer ら<sup>8)</sup>は K 3 ケラチンは角膜上皮、鼻、口唇粘膜、眼結膜上皮の一部に存在する上皮であると報告している。今回使用した AE 5 は K 3 ケラチンに特異的な抗体であり、正常角膜上皮は陽性を示す。移植後 10, 20 日目とも移植群で陽性所見がなかったことから、受傷後の角膜上皮は正常な宿主の角膜上皮が伸展して、置き換わったものではないと考えられた。次に、結膜下組織を比較すると、非移植群では疎な膠原線維と、多数の線維芽細胞があるのに対して、移植群では密な膠原線維の中に萎縮した線維芽細胞が多数観察された。活動期の線維芽細胞は細胞間物質の活発な産生を行い、細胞質の構造は機能を反映して粗面小胞体などが著明に発育し複雑となる。一方、創傷治癒過程が終了した段階での線維芽細胞は、細

胞質の一部が細胞から離断し、細長い細胞に変化し細胞突起には細胞質微原線維の他、核や小器官はほとんどなくなる<sup>9)</sup>。以上から、移植群でみられた萎縮した線維芽細胞は、移植結膜上皮下の創傷治癒過程が終了したことを示していると考えられた。輪部上皮の解剖学的特徴としては、上皮が角膜上皮と結膜上皮の両方の性質を合わせもつが、結膜上皮に特有な胚細胞を欠いている点が挙げられる<sup>10)</sup>。今回の実験では移植群における創傷治癒が完了することにより、輪部組織が再構築されたことが組織学的に観察できたものと考えられた。

これらの所見から、結膜移植後に創傷治癒が進むにつれて、移植結膜の上皮は結膜上皮としての性質を失い、角膜上皮としての性質を有するようになっている可能性が推定された。

アルカリ外傷眼における結膜移植術では、移植結膜上皮下や強膜と強固に接着する瘢痕組織が輪部に形成されることがわかった。また、移植結膜によって形成された瘢痕組織が角膜への細胞浸潤や結膜侵入を抑制し、輪部組織の再構築により上皮の再生治癒を安定させることが結膜移植の奏効機序の 1 つであると考えられ、受傷後早期に壊死組織を外科的に切除し、結膜移植により創傷治癒を促進させることが临床上重要であると考えられた。

## 文 献

- 1) **Thoft RA** : Conjunctival transplantation. Arch Ophthalmol 95 : 1425—1427, 1977.
- 2) **Thoft RA** : Keratoepithelioplasty. Am J Ophthalmol 97 : 1—6, 1984.
- 3) **Kim JC, Tseng SCG** : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 14 : 473—484, 1995.
- 4) **木下 茂, 大橋裕一, 眞鍋禮三, Gravagna P, Tardy M, Tayot J-L** : 4 型コラーゲンによる輪部形成術の試み. 臨眼 44 : 1009—1011, 1990.
- 5) **齋藤圭子, 庄司 純, 高浦典子, 崎元 卓, 澤 充** : アルカリ腐蝕眼に対する角膜上皮形成術後混濁例の免疫組織化学的検討. 日眼会誌 100 : 401—408, 1996.
- 6) **天野史郎, 澤 充, 石井康雄** : ラットにおける keratoepithelioplasty モデルの作製とその組織学的検討. 日眼会誌 96 : 1366—1372, 1992.
- 7) **Kenyon KR** : Anatomy and pathology of the ocular surface. Int Ophthalmol Clin 19 : 3—35, 1979.
- 8) **Schermer A, Galvin S, Sun TT** : Differentiation-related expression of a major 64 K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol 103 : 49—62, 1986.
- 9) **梶川欽一郎** : 結合組織細胞. 小川和朗, 他(編) : 細胞学大系 7 朝倉書店, 東京, 141—184, 1971.
- 10) **壇上真次** : 5. 角膜輪部. 木下 茂, 他(編) : 角膜クリニック. 医学書院, 東京, 11—12, 1990.