

片眼角膜に特異なフルオレセイン濃染像のみられた症例

加藤 弘明¹⁾²⁾, 横井 則彦¹⁾, 谷岡 秀敏¹⁾, 外園 千恵¹⁾, 細谷 友雅¹⁾, 木下 茂¹⁾¹⁾京都府立医科大学医学部眼科学教室, ²⁾国立長寿医療センター眼科

要 約

背景：角膜のフルオレセイン濃染像は一般に上皮バリアー機能障害でみられ、他の機序でみられた報告はない。

症 例：66 歳女性。左眼の霧視と異物感を主訴に近医受診。当初、左眼に点状表層角膜症がみられたが経過中にフルオレセイン濃染像を示すようになった。薬剤毒性が疑われ点眼を中止されるも改善なく、当科を紹介された。当科では人工涙液と副腎皮質ステロイド薬の点眼・内服を試みたが改善なく、濃染像はほぼ角膜全面を占めるようになった。経過中、生体共焦点顕微鏡で角膜上皮を観察したところ雲状に上皮像を欠く領域がみら

れ、検査直後に上皮障害を伴わずに濃染像と霧視が改善した。何らかの物質の角膜への付着を疑い impression cytology と免疫染色を行ったところ、付着物は MUC16 に強陽性の所見を示した。

結 論：本症例の角膜上皮はフルオレセインに濃染される物質で被覆され、その物質と MUC16 との関連を認めた。(日眼会誌 113 : 913—919, 2009)

キーワード：フルオレセイン濃染像, MUC16, MUC5AC, 生体共焦点顕微鏡, 角膜上皮バリアー

A Case Presenting Peculiar Staining with Fluorescein on the Unilateral Cornea

Hiroaki Kato¹⁾²⁾, Norihiko Yokoi¹⁾, Hidetoshi Tanioka¹⁾
Chie Sotozono¹⁾, Yuka Hosotani¹⁾ and Shigeru Kinoshita¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine²⁾Department of Ophthalmology, National Center for Geriatrics and Gerontology

Abstract

Background : Corneal staining with fluorescein resulting from a cause distinct from that of general epithelial barrier disturbance.

Case : A 66-year-old woman saw her doctor complaining of blurred vision and foreign-body sensation in her left eye. Superficial punctate keratopathy (SPK) was detected on her left cornea. Following instillation of some eye drops, the patient developed corneal staining with fluorescein. Assuming that the staining was due to drug toxicity, eye-drop instillation was discontinued but the staining did not improve and her doctor then referred her to us. Although we tried glucocorticosteroid and artificial tear eye drops, the staining spread until it covered the patient's cornea almost completely. On a following day, we attempted to observe the patient's cornea by confocal microscopy, yet her corneal epithelium could only partially be

seen due to what can best be described as a "black-cloud-like" formation on her cornea. However, immediately following that observation the corneal staining diminished without epithelial disturbance and the patient's symptoms were improved. Suspecting that some foreign materials may be stuck to her cornea, we performed impression cytology and detected the existence of MUC16.

Conclusion : The patient's corneal staining may have resulted from her cornea being covered by materials related to MUC16.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 913—919, 2009)

Key words : Corneal staining, MUC16, MUC5AC, Confocal microscopy, Corneal epithelial barrier

別刷請求先：602-0841 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 横井 則彦
(平成 20 年 11 月 11 日受付, 平成 21 年 4 月 8 日改訂受理) E-mail : nyokoi@koto.kpu-m.ac.jp

Reprint requests to : Norihiko Yokoi, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine,
465 Kajicho, Hirokouji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyuu-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received November 11, 2008 and accepted in revised form April 8, 2009)

I 緒 言

これまでフルオレセインは角結膜の上皮障害領域において上皮細胞同士の間には拡散するか、あるいは上皮細胞が脱落した部位に貯留すると考えられてきた。しかし、現在では健全な上皮細胞も染色するといわれる。またフルオレセインは他に臨床によく使われる色素であるローズベンガルとは異なり、アルブミンやムチンといった涙液成分によって染色が妨げられることはないが、その濃度や量、眼表面の pH、重金属やハロゲン化物などの存在によって染色の程度が変化するとされる^{1)~7)}。

臨床の場合では、一般的に角膜のフルオレセイン濃染像は上皮のバリアー機能障害で認められ、上皮バリアー機能障害による角膜上皮障害は点状表層角膜症型、透過性亢進型、結膜上皮型の3つの型に分類される⁸⁾。

点状表層角膜症型は表層上皮細胞が脱落した部分が散在する病態であり、表層上皮細胞間の tight junction の障害を主体とする上皮障害と考えられている。またこの型は、表層上皮細胞の脱落部位に一致してフルオレセインが貯留して点状表層角膜症として観察され、ドライアイ、アトピー性角膜炎、春季カタル、薬剤性角膜上皮障害などでみられる。

透過性亢進型は最表層細胞の細胞膜障害が病態に大きくかかわっていると推測される病態で、フルオレセイン染色時にフルオレセインが角膜内に染み込んだような所見 (delayed staining) を呈し、薬剤毒性、膠様滴状角膜ジストロフィ、糖尿病角膜上皮症、ソフトコンタクトレンズ (SCL) 装用後の上皮障害などでみられる。

結膜上皮型は結膜上皮が角膜上に被覆している病態であり、結膜のバリアー機能が角膜に比べて弱いこと⁹⁾¹⁰⁾が原因でフルオレセイン染色時に結膜上皮で被覆されている部分が軽度の透過性亢進型 (delayed staining) の上皮障害のように観察される。化学腐食や薬剤性偽類天疱瘡などがこの型の代表例である。

今回、以上のいずれとも異なると思われる機序で、片眼角膜の特異なフルオレセイン濃染像を示す症例を経験したので報告する。

II 症 例

症例：66歳、女性。

初診日：2006年4月24日。

主訴：左眼の霧視、異物感。

現病歴：2006年2月頃より左眼の霧視、異物感にて近医を受診。左眼角膜に逆C字型の点状表層角膜症 (superficial punctate keratopathy : SPK) に類似した密度の濃い上皮障害を認めたため、ヒアルロン酸、0.3% ノルフロキサシン、0.1% フルオロメトロン点眼にて経過観察されていたが、改善しなかった。2006年4月初めより SPK 様の上皮障害の密度がさらに濃くなり、その範

囲の拡大を認めたため薬剤性角膜上皮障害を疑われ、防腐剤フリーの人工涙液 (ソフトサンティア®) 点眼のみで経過観察された。しかしその後も所見の改善が認められなかったため、2006年4月24日に当院を紹介されて受診した。

既往歴：特記すべきことなし

初診時所見：右眼に特記すべき所見は認めず、左眼角膜の10時から6時方向にかけて逆C字型の外観を示すフルオレセインの濃染像を認めた (図1)。フルオレセイン濃染領域はリサミングリーンやローズベンガルには染色されず、眼瞼結膜および球結膜には特記すべき所見はなかった。視力は右 0.8 (1.2× +3.00 DCyl-3.00 D Ax 90°)、左 0.8 (1.2× +2.75 DCyl-2.25 D Ax 90°) であり、フルオレセイン breakup time は右眼4秒、左眼1秒、シルマーテスト I 法は右眼3 mm/5 min、左眼4 mm/5 min であった。

経過：防腐剤フリー人工涙液と副腎皮質ステロイド薬の点眼・内服で経過をみていたが改善なく、治療用 SCL (1 day AQUUVUE®, O₂ OPTIX®) 装用を試みたところ、症状・濃染像の改善を認めたが、中止すると再発した (図2)。このため SCL の装用と中止を繰り返していたが、病態を探るために生体共焦点顕微鏡 [(HRT II-Rostock Cornea Module (HRT II-RCM))] による病変部の観察を行ったところ、フルオレセイン濃染領域は低輝度の雲状の構造物に被覆され、角膜上皮細胞の観察は困難であった (図3)。しかし HRT II-RCM による病変部観察中、プローブを移動させるにつれて低輝度の雲状の構造物は徐々に消失し、観察終了直後のフルオレセイン染色ではほとんど上皮障害を伴うことなく濃染像は消失し、霧視の改善が得られた (図4)。その再発性と HRT II-RCM の所見から本症例の角膜上皮はフルオレセインに濃染性を示す何らかの内因性物質によって覆われていると考えられたため、ニトロセルロース膜を用いて角結膜表層の impression cytology 標本を作製し、膜に付着させたまま間接抗体法にて免疫染色¹¹⁾を施行し、MUC16 と MUC5AC についての検討を行った。その結果、患者の角膜上には健常者の角膜と比較して MUC16 が多くみられた。一方、MUC5AC は角膜では患者と健常者の差を認めず、結膜では健常者の goblet cell と思われる部位のみに認められた (図5 A, 5 B)。なお免疫染色の方法としては、一次抗体に抗 Muc16 (Ov 185, abcam Inc., MA, USA) および抗 Muc5AC (CLH 2, Novocastrolaboratories Ltd., Benton Lane, UK)、二次抗体には Alexa 488 ラベル抗マウス IgG を使用した。また陰性対照には一次抗体の代わりに非標識のマウス IgG 1 を使用し、さらにプロピジウムアイオダイトで対比染色として核染色も行い、膜のまま組織付着面をカバーガラス上にマウントして共焦点レーザー顕微鏡にて連続断層像を取得し、立体再構成後に組織表面付近のスライス像を観察

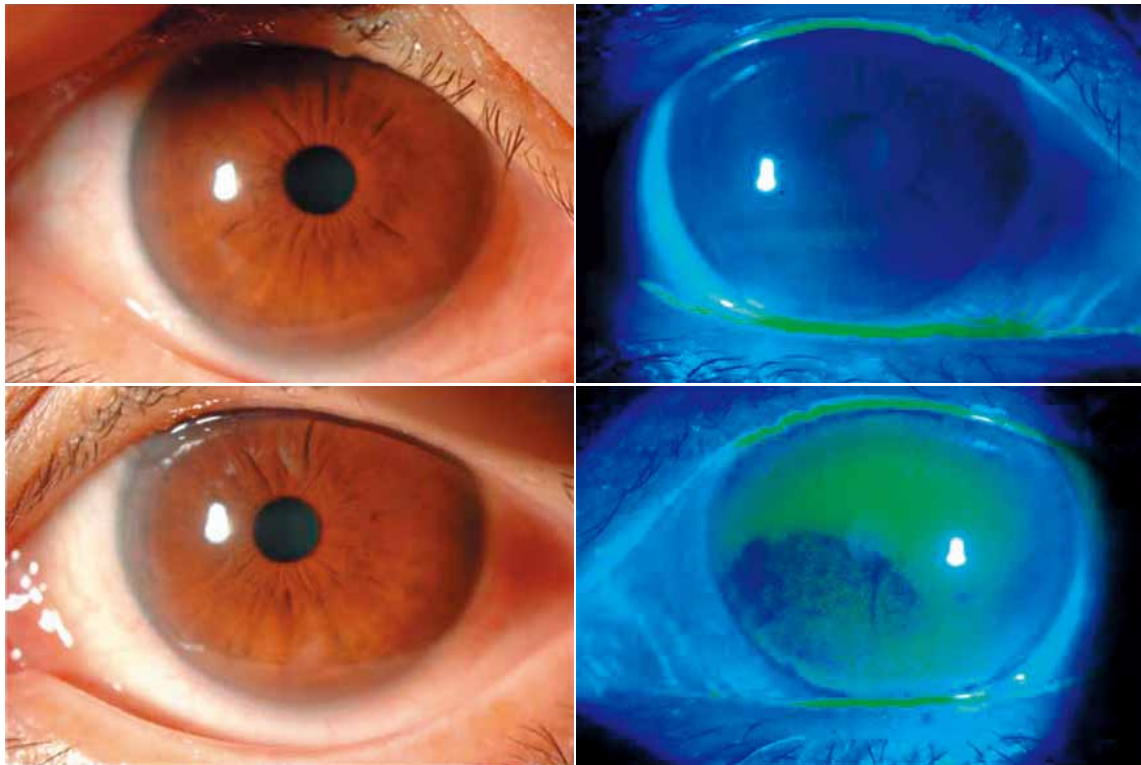


図 1 当科初診時の前眼部写真.

左上：右眼前眼部写真，右上：右眼フルオレセイン染色写真，左下：左眼前眼部写真，右下：左眼フルオレセイン染色写真。
 左眼角膜のみに 10 時から 6 時方向にかけて逆 C 字型の外観を示すフルオレセインの濃染像を認める(右下).

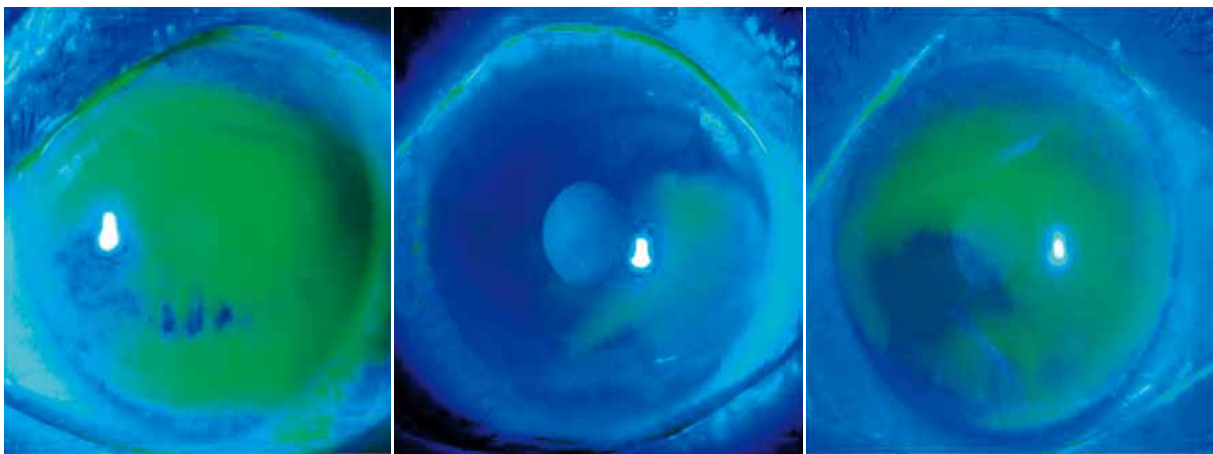


図 2 治療用コンタクトレンズ(SCL)の装用による左眼フルオレセイン染色所見の変化.

左：SCL 装用前，中：SCL 装用後 7 日目，右：SCL 装用中止後 4 日目。
 SCL 装用によってフルオレセイン濃染像は改善した(中)が，SCL 装用中止により再発した(右).

した.

Ⅲ 考 按

日常臨床において角膜のフルオレセイン濃染像は，上皮のバリアー機能障害で認められるのが一般的であり，上皮バリアー機能障害による角膜上皮障害は点状表層角膜症型，透過性亢進型，結膜上皮型の 3 つの型に分類さ

れる⁸⁾。しかし，本症例はこのいずれとも異なる機序によってフルオレセイン濃染像を呈したと考えられた。

本症例では，HRT II-RCM による観察時に角膜表面が低輝度の雲状の構造物によって被覆され，上皮細胞の観察が困難であったが，プローブを移動させるにつれて低輝度の雲状の構造物は消失した。また，HRT II-RCM 施行直後にはほとんど上皮障害を伴うことなく濃

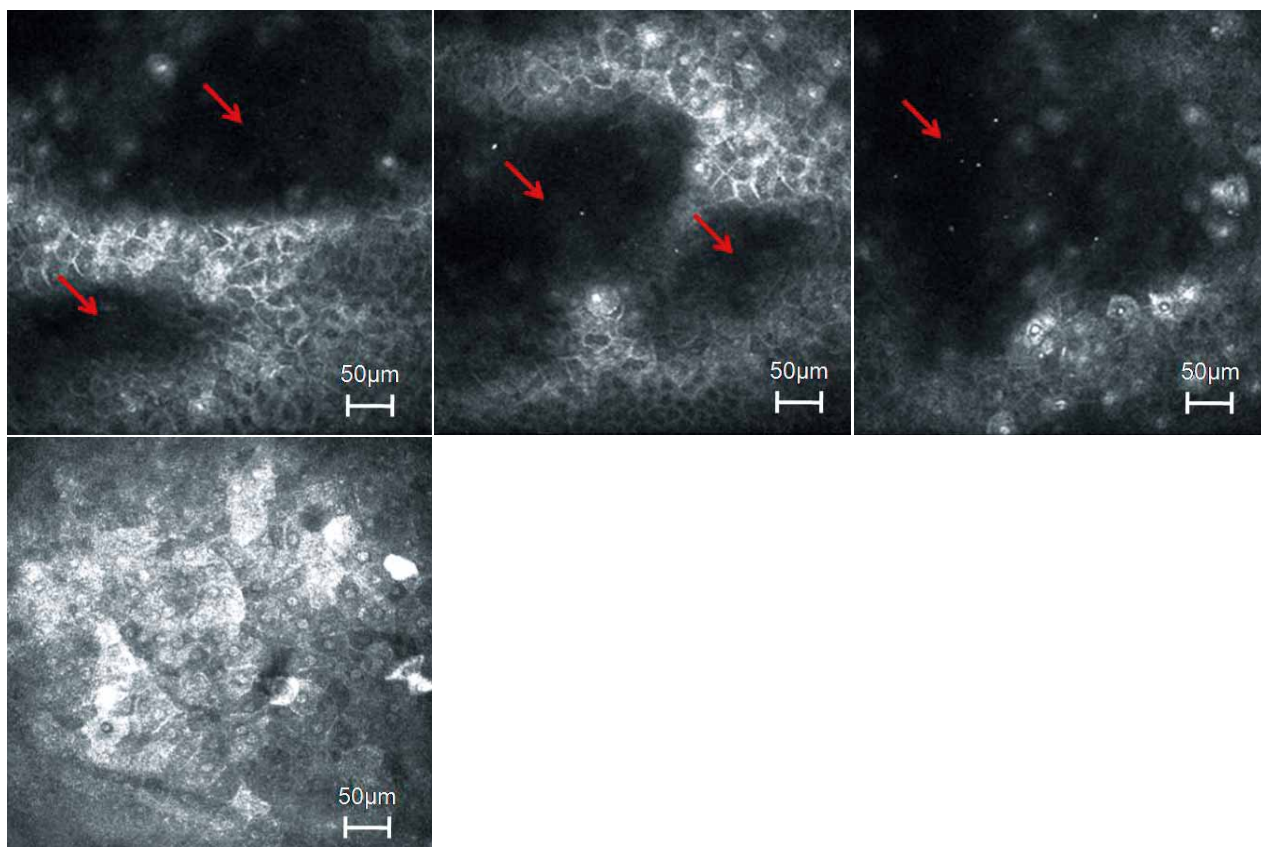


図 3 生体共焦点顕微鏡[HRT II-Rostock Cornea Module(RCM)]所見.

上段：患眼，下段：健眼.

患眼ではフルオレセイン濃染領域は低輝度の雲状の構造物(矢印)に被覆され，角膜上皮細胞の観察が困難であった．一方，健眼では雲状の構造物は観察されなかった．

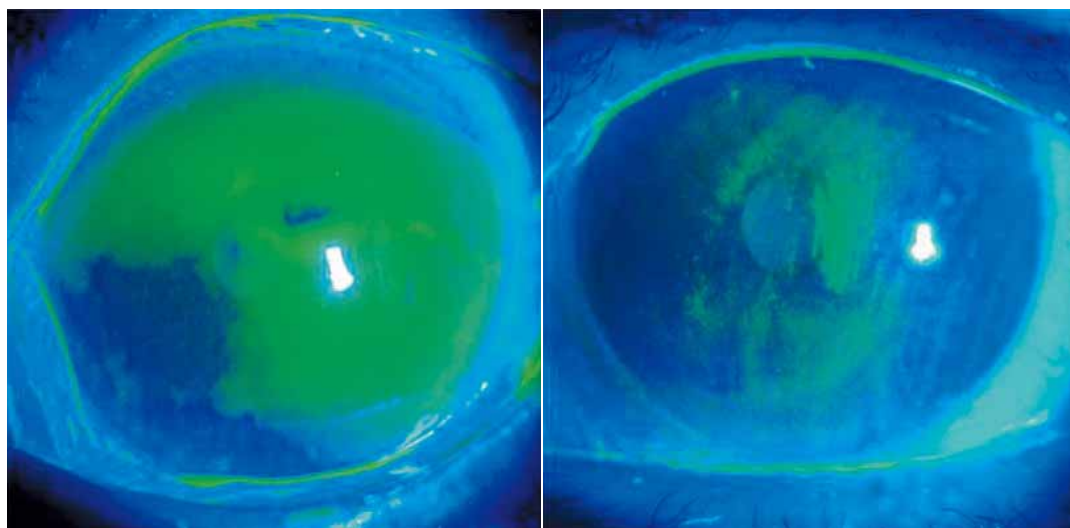


図 4 HRT II-RCM 施行前後の左眼のフルオレセイン染色所見.

左：HRT II-RCM 施行前，右：HRT II-RCM 施行直後.

HRT II-RCM 施行後にフルオレセイン染色を行うとほとんど上皮障害を伴うことなく濃染像は消失した(右).

染像の改善を認めた．以上のことから，本症例では何らかの物質が角膜表面を被覆しており，HRT II-RCM のプローブ先端が角膜表面を接触しながら移動することによって，その物質が剥ぎ落とされたのではないかと推察

された．

また，SCL 装用と装用中止によってフルオレセイン濃染像の改善・再発がみられたことについても，SCL 装用時には角膜上に付着した構造物が SCL と直接接触

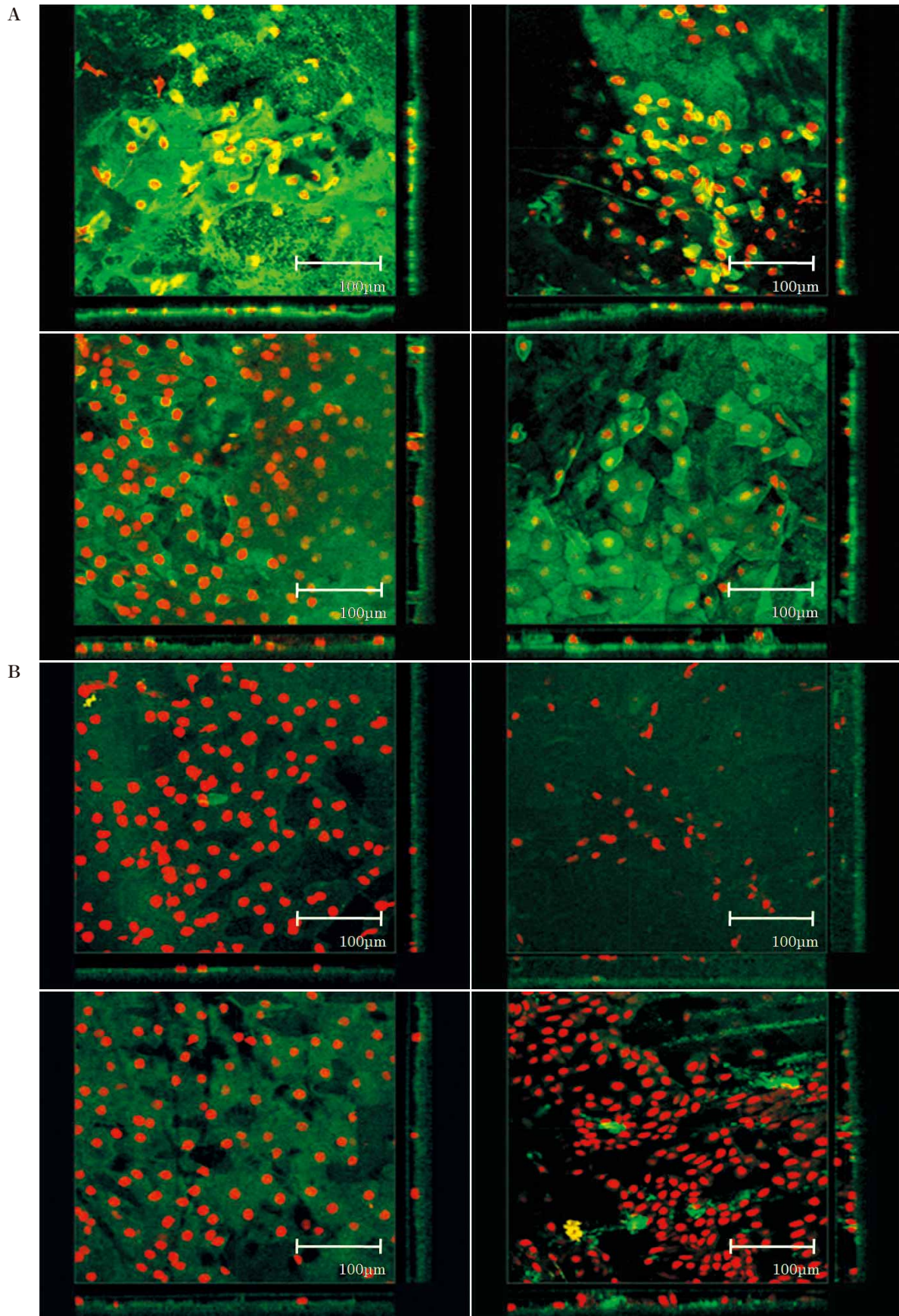


図 5 患眼角結膜の impression cytology (免疫染色)。

A : MUC16 (左上 : 患眼角膜 ; 右上 : 患眼結膜 ; 左下 : 健常者角膜 ; 右下 : 健常者結膜)。緑色 : MUC16 陽性所見, 赤色 : 核染色。患者の角膜上には健常者の角膜と比べて MUC16 が多くみられた。

B : MUC5AC (左上 : 患眼角膜 ; 右上 : 患眼結膜 ; 左下 : 健常者角膜 ; 右下 : 健常者結膜)。緑色 : MUC5AC 陽性所見, 赤色 : 核染色。MUC5AC は健常者結膜の goblet cell と思われる部位に認められた。

して擦れることによって剥がれ落ち、かつ SCL がバリアーとなって新たに構造物が角膜に付着するのを妨げることによってフルオレセイン濃染像は改善し、SCL 装用中止時にはこれらのメカニズムがなくなることでフルオレセイン濃染像が再発したと推定された。

著者らは本症例の角膜上皮はフルオレセインに濃染性を示す何らかの内因性物質によって覆われているものと考え、その物質の候補としてムチンを疑った。

ムチンは 20 万以上の分子量の高分子の糖蛋白質の総称であり、分子の芯となるコア蛋白質に存在する、8~169 のアミノ酸が 1 つの単位となって連続する tandem repeat と呼ばれる構造の種類により分類され、現在ヒトでは MUC1 から MUC20 まで報告されている¹²⁾。また、ムチンは細胞膜を貫通した状態で存在する膜型ムチンと、細胞から分泌されて自由に動くことができる分泌型ムチンに分けられ、眼表面上皮では膜型ムチンとしては MUC1, MUC4, MUC16 が存在し¹³⁾、分泌型ムチンとしては MUC5AC が存在するとされる。さらに、MUC1 の mRNA は角膜上皮、結膜上皮のすべての細胞にみられるが、蛋白質レベルでは角膜上皮の表層細胞と結膜上皮の表層細胞・表層下細胞にしかみられないと報告されている¹²⁾。一方、MUC4 の mRNA はほとんどが結膜上皮で発現しており、角膜上皮では周辺部から中央部にむかうにつれて、その発現量は著明に減少するとされる¹²⁾。MUC16 は角膜上皮の表層細胞と結膜上皮の表層細胞・表層下細胞で発現がみられ、MUC5AC は結膜の杯細胞 (goblet cell) で産生・分泌され、涙液中ムチン層を主に構成するとされる¹²⁾。

本症例においては、フルオレセインに濃染され角膜表面に付着していると考えられた物質の候補として MUC1, MUC4, MUC16, MUC5AC が考えられたが、impression cytology 標本では一般に検体量が少ないため、眼表面に分布する 3 種類の膜型ムチンの中で技術的に最も検出しやすいと考えられた MUC16 と、候補の中で唯一の分泌型ムチンである MUC5AC の 2 種類のムチンについての検討を行った。その結果、本症例のフルオレセイン濃染性を示す物質と MUC16 の関連が示唆され、フルオレセインに濃染する領域で MUC16 が過剰発現している可能性が考えられた。一方、眼表面に存在する膜型ムチン (MUC1, MUC4, MUC16) は上皮細胞の細胞膜から涙液中に切離される形をとる (shedding) ことが報告されている¹¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ため、過剰産生されて shedding された MUC16 が角膜表面に付着している可能性も考えられた。

HRT II-RCM でムチンなどの粘液は、一般に高輝度の物質として観察されることが多く、また HRT II-RCM を用いて皮膚を観察した場合には、皮下組織までも観察することが可能である。それらの点から考えると、角膜表層細胞が見えなくなるほどに、ムチン (MUC16)

が HRT II-RCM のレーザー光をシャットアウトして低輝度の黒い雲状の所見として観察されるというのは考えにくい。しかし HRT II-RCM による観察中、プローブを動かすにつれて黒い雲状の所見が薄れ、角膜表層細胞が見えやすくなったこと、および HRT II-RCM による観察直後にフルオレセイン濃染像が擦り取られたかのように消失したことを考慮に入れると、現象論的にフルオレセイン濃染領域が HRT II-RCM で認められた黒い雲状の所見に対応していると考えるのが妥当と考えられた。

また鑑別診断として、同様にムチンを主成分として角膜に付着を示すものに角膜糸状物や mucus plaque があるが、本病変が糸状の形態を示していなかったことや、網目状の外観をとっていないことから、まったく異なるものと考えられた。

いずれにしても、どのようにして片眼角膜に MUC16 に関連した物質が付着するに至ったかの原因、経緯については不明であり、MUC1, MUC4 について今回は検討を行っていないため、今後さらなる検討が必要と考えられた。

文 献

- 1) **Feenstra RP, Tseng SC** : Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology* 99 : 605—617, 1992.
- 2) **Mocan MC, Irkec M** : Fluorescein enhanced confocal microscopy *in vivo* for the evaluation of corneal epithelium. *Clin Experiment Ophthalmol* 35 : 38—43, 2007.
- 3) **Romanchuk K** : Fluorescein. Physicochemical factors affecting its fluorescence. *Surv Ophthalmol* 26 : 269—283, 1982.
- 4) **Newell FW, Vail D** : Fluorescein in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 67 : 272—274, 1969.
- 5) **Kim J** : The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol* 11 : 241—247, 2000.
- 6) **Wilson G, Ren H, Laurent J** : Corneal epithelial fluorescein staining. *J Am Optom Assoc* 66 : 435—441, 1995.
- 7) **Korb DR, Herman JP, Finnemore VM, Exford JM, Blackie CA** : An evaluation of the efficacy of fluorescein, rose bengal, lissamin green and a new dye mixture for ocular surface staining. *Eye Contact Lens* 34 : 61—64, 2008.
- 8) **Kinoshita S, Yokoi N, Komuro A** : Barrier function of ocular surface epithelium. *Advances in corneal research : selected transactions of the world cornea congress IV*. Plenum Press, New York, 47—55, 1998.
- 9) **Steuhl P, Rohen JW** : Absorption of horseradish peroxidase by the conjunctival epithelium of monkeys and rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 220 : 13—18, 1983.

- 10) **Huang AJW, Tseng SCG, Kenyon KR** : Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 684—689, 1989.
 - 11) **Spurr-Michaud S, Argueso P, Gipson IK** : Assay of musins in human tear fluid. *Exp Eye Res* 84 : 939—950, 2007.
 - 12) **Gipson IK** : Distribution of musins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 78 : 379—388, 2004.
 - 13) **Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argueso P, Gipson IK** : Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 114—122, 2004.
 - 14) **Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argueso P, Gipson IK** : Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 114—122, 2004.
 - 15) **Paulsen F, Jager K, Worlitzsch D, Brauer L, Schulze U, Schafer G, et al** : Regulation of MUC 16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines. *Ann Anat* 190 : 57—59, 2007.
-