

角膜上皮欠損創傷治癒過程に及ぼす各種点眼液の影響

—量的および質的变化について—(図12)

松本雄二郎 (筑波大学臨床医学系眼科)

The effects of topically applied drugs on the abraded rabbit cornea.

Yujiro Matsumoto

Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, the University of Tsukuba

要 約

点眼液の毒性あるいは効果を調べるために、正常ウサギ角膜上皮欠損を作製し、その創傷治癒過程に対する各種点眼液による影響を角膜上皮欠損創傷治癒曲線と角膜上皮欠損治癒直後の角膜上皮細胞の状態を走査電子顕微鏡を用いて検討し、次のような結果ならびに結論を得た。1. 角膜上皮欠損創傷治癒曲線は、フィブロネクチン、0.3%硫酸マイクロノマイシンでは影響なかったが、0.3%硫酸ゲンタマイシン、5%ピマリシンでは、著しい創傷治癒遅延が生じ、とくに、5%ピマリシンは、初期の migration 期より著しく障害があらわれた。2. 走査電子顕微鏡所見では0.3%硫酸ゲンタマイシン、5%ピマリシンでは、角膜上皮剝離、細胞核の突出、原形質膜皺襞、microvilli の消失化などが、とくに dark cell 中心に出現したが、これらの変化は、0.3%硫酸マイクロノマイシン、フィブロネクチンには認められなかった。3. フィブロネクチンの点眼は、われわれの行なった方法では角膜上皮創傷治癒促進を認められなかった。4. 抗真菌剤として市販される5%ピマリシン然使用に際し、細胞毒性が非常に強いいため注意する必要があると思われた。(日眼 91:72—79, 1987)

キーワード：角膜上皮創傷治癒，点眼液による角膜上皮障害，ピマリシン，フィブロネクチン

Abstracts

Masked, controlled animal studies were done to determine the effects of topical agents on the healing process of the experimentally made epithelial defect of the rabbit's cornea. 0.3% micronomicin, 0.3% gentamicin, 5% pimaricin and fibronectin drops were used for the present experiments. Of these drugs, gentamicin and pimaricin brought pathological changes to the regeneration of the corneal epithelium and retarded the closure of the epithelial defective area. Particullary, pimaricin gave much toxic changes to the regenerating epithelium; wrinkling of plasma membrane, loss of microvill, rapture of intercellular tight junction, and peeling of the top epithelial cell. In our studies, fibronectin neither accelerated the regeneration of the epithelium nor acted toxically. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 72—79, 1987)

Key words: wound healing, cell toxicity, pimaricin, fibronectin

別刷請求先：305 茨城県新治郡桜村天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系眼科 松本雄二郎

Reprint requests to: Yujiro Matsumoto, M.D. Dept. of Ophthalmol., Institute of Clinical Med., Univ. of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki-ken 305, Japan

(昭和61年5月28日受付) (Accepted May 28, 1986.)

緒 言

点眼液は眼組織内への透過性を考慮し高濃度であるため、点眼により角膜あるいは結膜に障害を与えうることが知られている。特に角膜潰瘍や角膜糜爛などに対し点眼液が使用される場合、病的状態の角膜上皮細胞であるため、より一層の障害が生ずる可能性がある。しかし、病的状態の角膜上皮に対する点眼液の影響はほとんど検討されていないのが現状である。そこで、角膜上皮欠損創傷治癒過程のいかなる時期に、どの程度の影響が点眼液の使用により生ずるかを知らぬことは臨床的に極めて重要であり、薬剤の安全性とその効果を検討する上で不可欠と考えられる。

今回、著者はすでに日誌¹⁾に報告した角膜上皮創傷治癒モデルを用いて、近年開発され臨床に注目されているマイクロマイシン、ゲンタマイシン、ピマリシン、フィブロネクチン²⁾³⁾の点眼液を用いて、各薬剤の角膜上皮に対する影響を角膜上皮欠損創傷治癒曲線と角膜上皮欠損創傷治癒直後の角膜上皮の走査電子顕微鏡を用いて検討した。そして、それらの点眼液の使用に際し有用な新知見を得たので報告する。

実験方法及び材料

実験動物は細隙顕微鏡検査で眼疾を認めない体重1.8kg~2.3kgのNew Zealand白色ウサギ24羽48眼を使用した。ウサギ角膜上皮欠損モデル作製法は日誌¹⁾に記した方法によった。ベントバルビタール塩30mg/kg 静注による全身麻酔下にて眼球を脱臼させた上で、顕微鏡下に角膜中央部に、角膜上皮基底膜や角膜実質を障害することのないように、直径6.5mmの円形創を無水アルコールを濾紙により浸した後、替刃メス(Beavor blade 67)を用いて機械的擦過により作製した。

24羽48眼のウサギを4群(各群6羽12眼)に分け、角膜上皮欠損創作製直後より次の点眼液を使用した。

- (1) 群: 0.3%硫酸マイクロマイシン点眼群
- (2) 群: 0.3%硫酸ゲンタマイシン点眼群
- (3) 群: 5%ピマリシン点眼群
- (4) 群: フィブロネクチン点眼群

フィブロネクチン点眼液の作製は、New Zealand白色ウサギより採取した血液より Engvall と Ruoslahti の方法⁴⁾に従い行い、それを生理食塩水で約300 μ g/ml (pH 7.36, 浸透圧274mOs/l) に調整した。

点眼方法は、(1)~(3)群に対しては、角膜上皮欠

損創作製直後より30分毎に12時間、その後6時間毎に前記の薬液を右眼に、左眼にはコントロールとして生理食塩水を同時期に点眼した。(4)群のフィブロネクチン点眼液は、角膜上皮欠損創作製直後より6時間毎に右眼に点眼し、左眼にはコントロールとして生理食塩水を同時期に点眼した。

点眼開始後、0、6、12、24、36、48時間後に写真撮影し角膜上皮欠損部の面積測定を前報で述べた方法¹⁾で、ニコン万能投影器 V-24A (profile projector)、Hulet Packered社製のcomputered table digitizerを用いて測定した。

さらに、角膜上皮欠損消失直後に各群のNew Zealand白色ウサギ2羽4眼に対しベントバルビタール塩30mg/kgを耳静脈より注入した後、角膜中央の約5×5mm大の全層角膜片を切除し、その角膜片を2.5%グルタールアルデヒドカコジル緩衝液(pH 7.4)で2時間固定した。次にカコジル緩衝液で2.5%グルタールアルデヒドを灌流した後、1%オスミウム酸カコジル緩衝液で1時間の二重固定を行なった。そして上昇エタノール系列で脱水し酢酸イソアミルで脱アルコールし、臨界点乾燥装置(日立 HCP-1型)を用いて臨界点乾燥を行ないイオンコーター(エイコーエンジニアリング IB-3型)を用いて金蒸着した。標法は、熱電子放射型走査電子顕微鏡(日立 S-450)により角膜上皮の状態を観察した。

実験結果

1) 角膜上皮欠損創傷治癒速度への影響

角膜上皮欠損創傷治癒曲線は図1から図4に表わし

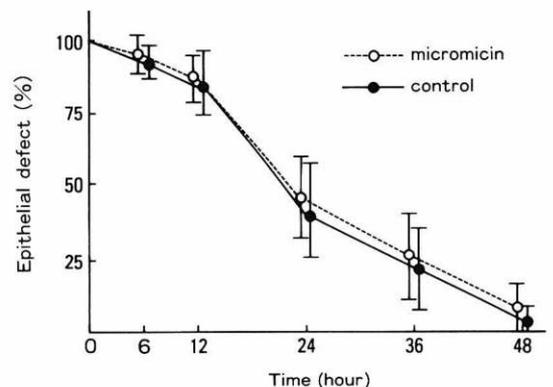


図1 角膜上皮欠損創傷治癒曲線、0.3%硫酸マイクロマイシン点眼群、コントロール群との間に差は認められない。

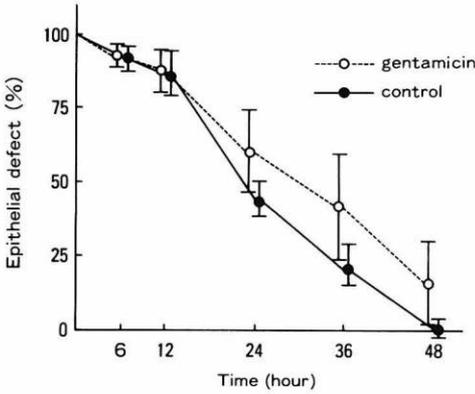


図2 0.3%硫酸ゲンタマイシン点眼群, 12時間以降に創傷治癒遅延が認められる。

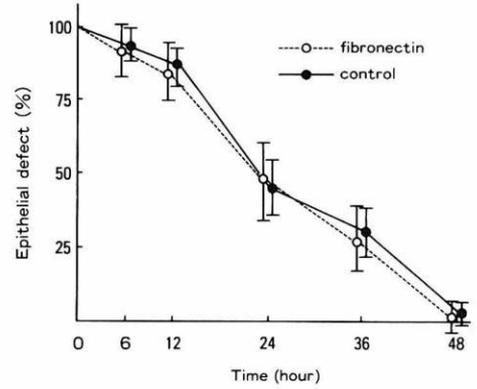


図4 フィブロネクチン点眼群, コントロール群との間に差は認められない。

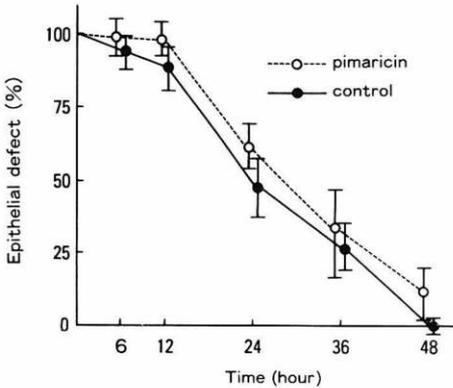


図3 5%ピマリシン点眼群, 創傷治癒開始早期より創傷治癒遅延が認められる。

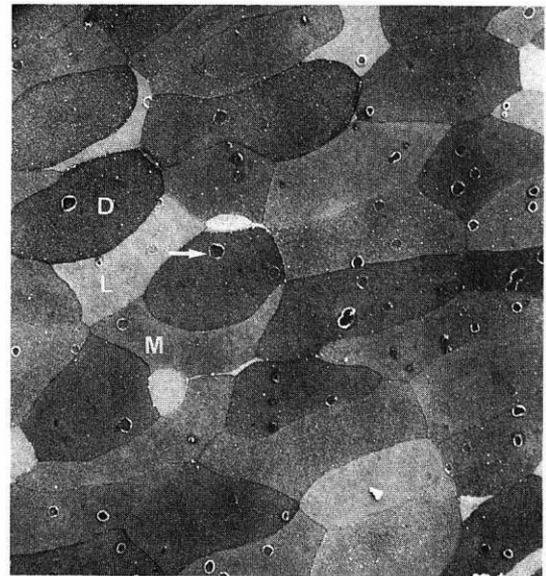
た。図では横軸に時間をとり、縦軸には創傷面積変化率、すなわち各経過時間における測定面積の創傷作製直後の面積に対する百分率をとった。破線は各種薬剤点眼群、実線はコントロール群の結果を示した。

(1) 群 (図1): 0.3%硫酸マイクロマイシン点眼群は生食点眼群との間に有意の差は認められなかった (t 検定, $p > 0.05$)。

(2) 群 (図2): 0.3%硫酸ゲンタマイシン点眼群はコントロール群と比較して、創傷治癒開始後24時間以降には、有意に再生が悪くなり創傷治癒遅延を生じていることが判明した (t 検定, $p < 0.05$)。

(3) 群 (図3): 5%ピマリシン点眼群はコントロール群に比べ、創傷治癒開始後よりすでに創傷治癒遅延が著しく生じていることが認められた (t 検定, $t < 0.05$)。

(4) 群 (図4): フィブロネクチン点眼群はコント



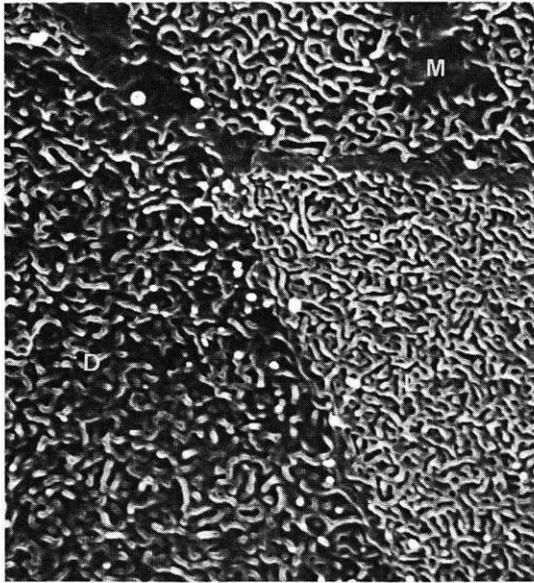
30KV 50U

図5 角膜上皮損傷治癒直後の角膜上皮の走査電子顕微鏡所見。生理食塩水点眼群, light cell (L), medium cell (M), dark cell (D) の3型に角膜上皮表層の細胞は区分できる。ウサギ正常角膜上皮細胞に見られる epithelial hole (矢印) は light cell に少ない。

ロール群との間には有意の差は認められなかった (t 検定, $p > 0.05$)。

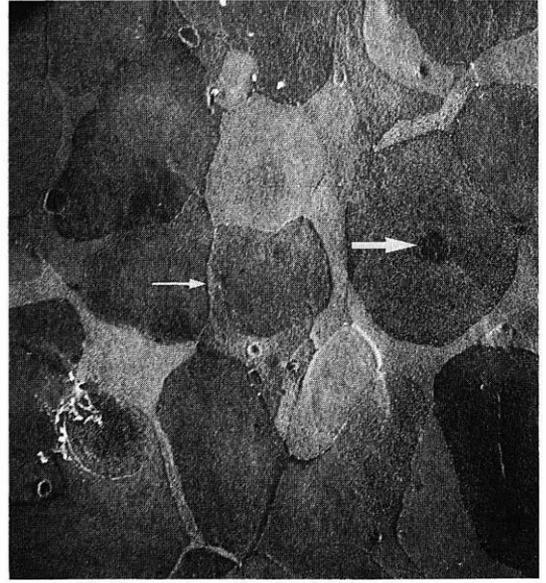
2) 角膜上皮欠損創傷治癒直後の走査電子顕微鏡所見

コントロールとして生理食塩水を点眼した角膜上皮の走査電子顕微鏡所見は, light cell, medium cell,



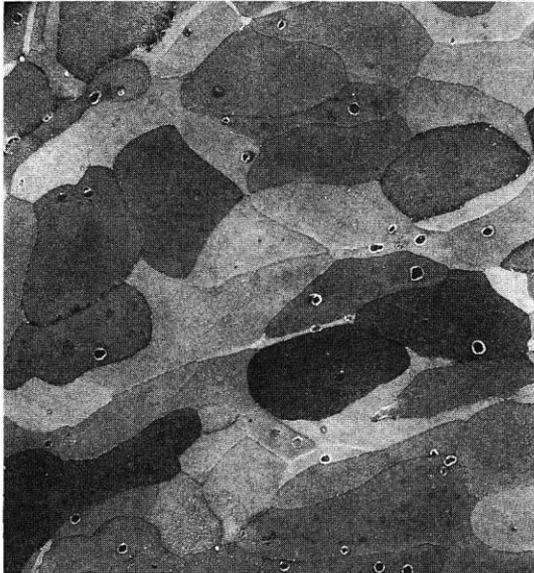
30KV 0.5U

図6 生理食塩水点眼群, microvilliの密度はlight cellが最も高いがmicrovilliの太さはlight cell(L), medium cell(M), dark cell(D)の間には差がないように思われる。



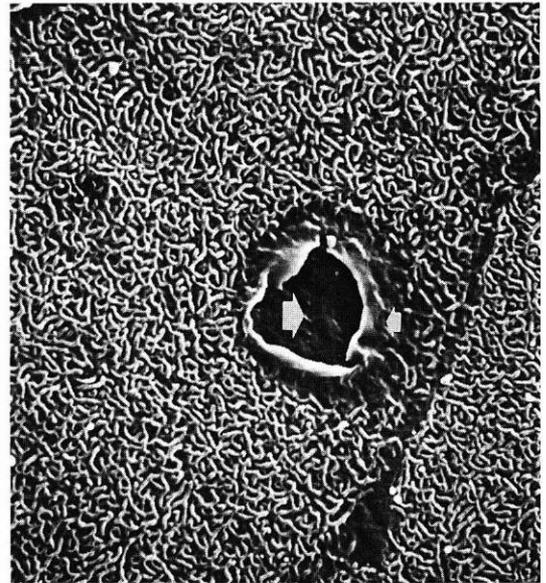
30KV 50U

図8 0.3硫酸ゲンタマイシン点眼群, 細胞間隙の離開と剝離(細い矢印), dark cellを中心とするmicrovilliの消失化と細胞核の出現(矢印)が認められる。



30KV 50U

図7 0.3%硫酸マイクロマイシン点眼群, コントロール群と比較して異常は認められない。



30KV 5U

図9 0.3硫酸ゲンタマイシン点眼群, Epithelial hole周囲, hole内のmicrovilliの消失化が認められる。(矢印)

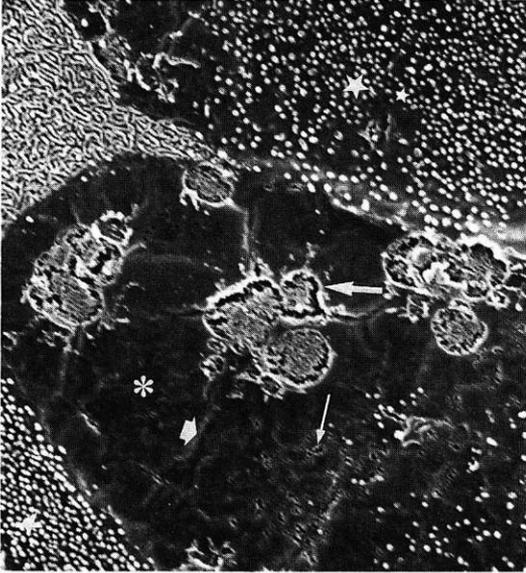


図 10

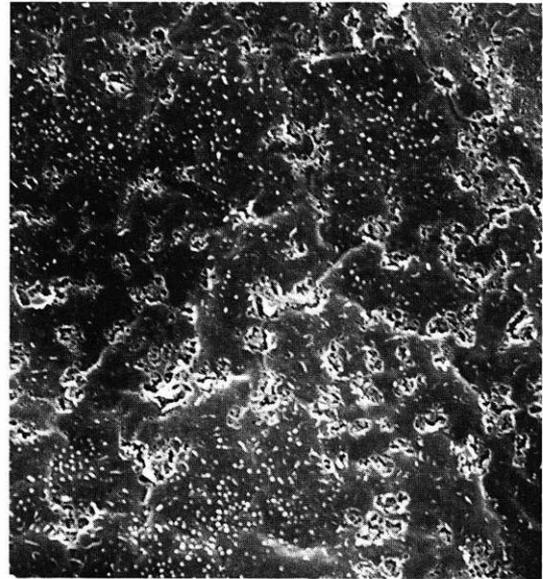


図 11

図10, 11 5%ピマリシン点眼群, 著しい細胞毒性を示している. 角膜上皮細胞表面の microvilli は減少 (星印), 消失し (星印), 況失化した細胞膜に多数の小孔 (矢印) が認められ, さらに無構造化した細胞表面には細胞膜皺襞 (太矢印) が認められる.

dark cell の3種類に明瞭に分類でき, その比率は, dark cell と medium cell は同程度に存在するが, light cell は少なかった. 角膜上皮創傷治癒直後の上皮細胞は大小不揃いの多角形をしていた (図5). Microvilli の密度は light cell, medium cell, dark cell の順に高いが, microvilli の直径は三者の間に差はないと考えられた (図6). Epithelial hole は dark cell と medium cell には比較的多く認められるが light cell には少なかった.

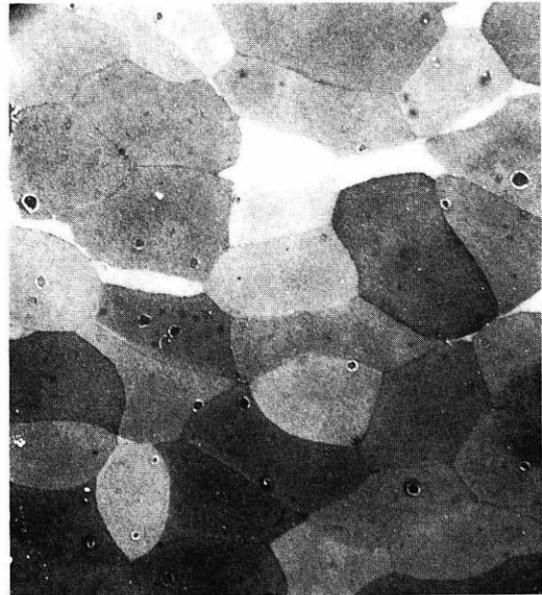


図12

フィブネクチン点眼群. コントロール群に比べ, 形態学的に異なる点は認められない.

(1)群の0.3%硫酸マイクロマイシン点眼群は, コントロール群と比較して走査電子顕微鏡所見上, 異常は認められなかった.

(2)群のゲンタマイシン点眼群では大きな不正形の dark cell が多数認められ, 一部細胞間隙の離開と剝離があり, dark cell の microvilli は消失化が見られ細胞核も出現した (図8). Epithelial hole では, epithelial hole 周囲の microvilli と epithelial hole 内の microvilli の消失化が認められた (図9).

(3)群の5%ピマリシン点眼群では角膜上皮に対し強い細胞毒性を示した. Microvilli の減少あるいは消失化がとくに dark cell に認められ細胞表面は無構造

化していた。無構造化した細胞表面はさざ波様の細胞皺襞を形成すると共に菲薄化し、小孔が多数認められた。細胞間隙も開大し剝離している所見も認められた(図10, 11)。

(4)群のフィブロネクチン点眼群では走査電子顕微鏡所見上、コントロール群と比較して異常は認められなかった(図12)。

考 按

1) 角膜上皮欠損創傷治癒への影響について

角膜上皮欠損創傷治癒は上皮細胞の turn over が早く代謝活動も盛んであるため、すみやかにおこなわれる。角膜上皮欠損がおこると、その創傷治癒過程は、初期1時間後には欠損周囲縁の角膜上皮細胞の収縮、円形化がおこり欠損縁を平滑にする。そして角膜輪部血管から遊出したと思われる網状の線維性物質が欠損縁角膜上皮細胞に付着し多核白血球が集まる。次に角膜上皮細胞間隙が拡大するとともに上皮細胞の ruffle と filopodia が出現し上皮細胞の sliding, migration がおこる⁶⁾。この ruffle, filopodia 内には microfilament が含まれており⁷⁾、細胞の移動に関与すると考えられている。初期の sliding, migration 期が終了すると角膜上皮は細胞分裂期になり、これより急速な創傷治癒がはじまり、角膜上皮の形態を整えつつ創傷治癒が完了する⁸⁾。創傷治癒過程の角膜上皮細胞は、細胞間の接着も不完全で、microvilli の発育も悪く角膜表層の barrier としての機能が低下しているため、点眼液の作用をより受け易いと考えられる。従って臨床上では角膜潰瘍、角膜糜爛など何らかの病的状態で点眼液を使用することが多いため、十分に注意せねばならないと考えられる。点眼液による角膜障害では、persistent epithelial defect, superficial punctate keratitis, subepithelial opacity, intraepithelial edema など種々のものが知られているが、今回、角膜上皮欠損創傷治癒速度から比較すると、0.3%硫酸ゲンタマイシン点眼群と5%ピマリシン点眼群ではコントロール群より著しく創傷治癒遅延がみられたが、一方、角膜上皮創傷治癒を促進すると考えられていたフィブロネクチン点眼群には創傷治癒促進効果は認められなかった。0.3%硫酸ゲンタマイシン点眼群、5%ピマリシン点眼群の角膜上皮欠損創傷治癒遅延の原因は、走査電子顕微鏡所見でも述べるように細胞毒性が原因であり、とくに5%ピマリシンは強い細胞毒性があり角膜上皮創傷治癒曲線から創傷治癒初期の migration

期にもすでに阻害効果があらわれると考えられる。0.3%硫酸ゲンタマイシンと5%ピマリシンは抗ウイルス剤と異なりDNA合成阻害、代謝拮抗剤ではないため角膜上皮細胞の分裂自体には影響を与えないが、直接的な細胞毒性のため角膜上皮が早く脱剥し細胞移動、接着などの cell kinetics を阻止するものと考えられた。

フィブロネクチンは血漿や細胞表面に存在する接着性糖蛋白質で角膜上皮細胞の伸展を促進すると同時に接着性を高めることで角膜上皮創傷治癒促進効果があると考えられ、難治性角膜上皮疾患の治療にも応用され²⁾³⁾ている。

In vitro および in vivo において眞鍋、西田らはフィブロネクチンは角膜上皮創傷治癒を促進するとしているが⁹⁾¹⁰⁾、今回の実験においてコントロールとの間に明らかな差を認められなかったのは次の点が考えられる。一つに角膜上皮創傷治癒を促進するには、今回行ったフィブロネクチンの点眼濃度、点眼回数ではコントロール群に輪部血管や涙液から自然にあらわれるフィブロネクチンによる創傷治癒効果と差がでないのではないかと推察された。また、角膜上皮欠損創作成時に使用したアルコールが角膜上皮創傷治癒に重要な役割りを果たすと考えられている⁷⁾角膜実質細胞を障害するため角膜上皮創傷治癒促進効果を検討する実験では不適切である可能性があるかと推察されたが、今後、さらに検討を要するようと思われる。

2) 走査電子顕微鏡による角膜上皮欠損創傷治癒直後の角膜上皮所見

走査電子顕微鏡による角膜上皮創傷治癒の所見は Pfister⁶⁾、Hoffmann^ら¹¹⁾¹²⁾により報告されている。Hoffmann は角膜表層の細胞を電子密度の差により light cell, medium cell, dark cell の3型に分類し、著しく経時的に light cell が medium cell, dark cell へと移行すると考えている。

正常角膜上皮の所見は、ほぼ六角形で規則正しい配列を示し、light cell, medium cell, dark cell の比率もほぼ同程度なのに対し、角膜上皮欠損創傷治癒直後の所見は細胞は大小不同で不規則で多角形を示し dark cell が多いと考えられる。角膜に対し細胞毒性をもつと考えられている点眼液には、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、縮瞳剤、表面麻酔剤などがあるが、これらによる角膜上皮の細胞毒性は非特異的であり¹³⁾、細胞表面が障害され microvilli が萎縮し小さくなり無構造となり細胞は剝離すると考えられる。今回の実験

で明らかに細胞毒性を認めたのは0.3%硫酸ゲンタマイシン、5%ピマリシンであり、とくに5%ピマリシン点眼群では多彩な強い細胞毒性を認めた。細胞毒性の程度をPfisterら¹³⁾は、次の3型に分類している。I型は、表面のmicrovilliの分布、大きさ、形も正常で、細胞間隙も異常なく、epithelial holeの数、形も正常で細胞毒性の全く認められない型。II型は、ほとんどの細胞は正常であるが、とくにdark cellに細胞毒性が認められ、microvilliの消失傾向と原形質膜の皺襞形成が認められる軽度細胞毒性のある型。III型は、非常に強い細胞毒性が認められ細胞死に致る型で、ほとんど完全にmicrovilliが消失し、原形質膜皺襞形成を生じるものである。Pfisterの分類からすると5%ピマリシンはIII型、0.3%硫酸ゲンタマイシンはII型に相当すると思われる。

今回の実験では、5%ピマリシンの角膜上皮欠損創傷治癒速度の遅延に相当して組織学的角膜上皮障害が著しかった。このことから走査電子顕微鏡所見で細胞毒性が強ければ、それだけ治癒速度が遅延することが考えられた。

アミノ配糖体は殺菌性(bactericidal)の抗生物質であり、細菌の蛋白合成阻害を細胞質内で行うと知られている。アミノ配糖体はその副作用として腎毒性、聴覚障害、眼科領域としては網膜色素上皮、網膜視細胞、そして今回示したように角膜上皮障害などがあげられる。このアミノ配糖体が副作用を引き起こす原因としてlysosome内に脂質を蓄積することにより生ずるdrug-induced lipid storage disorderと考えている説¹⁴⁾もあるが現在のところ明らかではない。そして、アミノ配糖体の中でもその種類による臓器への副作用の強さ、程度が異なる原因も明らかでないが、今回アミノ配糖体による角膜上皮障害がゲンタマイシン>マイクロノマイシンとあきらかに差がでたのは、細胞質内への透過性がゲンタマイシンのほうがマイクロノマイシンより高いため細胞毒性が強くてたのではないかと推察された。

そして、抗生物質の点眼液の中で最も使用されているゲンタマイシン点眼液は角膜上皮に中等度の細胞毒性が出現し、角膜上皮欠損創傷治癒遅延が生じることから、日常診療での抗生物質の点眼液の使用には充分注意する必要があることが確認された。

角膜真菌症は広域抗生剤、ステロイド剤、あるいは免疫抑制剤の使用とともに近年著しく増加傾向にある疾患¹⁵⁾であるが現在眼科領域で市販されている唯一の

点眼液は5%ピマリシン点眼液である。5%ピマリシン点眼液の細胞毒性は、Pfisterの分類のIII型を異わせる非常に強い毒性を示し、角膜表層ばかりでなく角膜実質の浮腫、混濁、さらには虹彩炎も惹起する¹⁶⁾のでその使用方法には充分の注意を要する必要がある。ピマリシンの他に使用可能な抗真菌剤として、アンホテリシンB、ケトコナゾール、ミコナゾール、フルシトシンなどがあるが、眼局所に用いると、ミコナゾール、フルシトシンはあまり障害はあらわれないが、アンホテリシンB、ケトコナゾールは著しく角膜上皮細胞毒性があらわれるとされ¹⁷⁾、今後角膜真菌症の局所治療剤としてはさらに検討されねばならないと考えている。またフィブロネクチンを除く各種薬剤には防腐剤として0.0025%~0.005%塩化ベンザルコニウムが含まれ、これによる角膜上皮障害の報告もある¹⁸⁾が、各種点眼剤の塩化ベンザルコニウムの濃度が低く、0.3%硫酸マイクロマイシン点眼群でも角膜上皮には障害は認められなかったため、今回の実験系においては防腐剤による影響はなかったと考えられた。

なお、0.3%硫酸マイクロノマイシンは参天製薬株式会社、0.3%硫酸ゲンタマイシンはエセックス日本株式会社、5%ピマリシンは千寿製薬株式会社より供与されたものを使用した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきました本村幸子教授、大島祐之前教授、石橋康久講師、基礎医学系伊藤隆造助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 松本雄二郎, 石橋康久: 角膜上皮創傷モデルの作製とその治癒過程の検討. 日眼 88: 1329—1334, 1984.
- 2) 林 正男, 平野英保: フィブロネクチンの構造と機能. 蛋白質・核酸・酵素 28: 169—181, 1983.
- 3) 松本雄二郎, 石橋康久, 河野恵子, 河野一郎: 難治性角膜上皮疾患に対するフィブロネクチン点眼療法. 眼臨 79: 622—625, 1985.
- 4) Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R: Fibronectin. Arch Ophthalmol 101: 1046—1048, 1983.
- 5) Engvall E, Ruoslahti E: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. Int J Cancer 20: 1—5, 1977.
- 6) Pfister RR: The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: A scanning electron microscope study. Invest Ophthalmol 14: 648—661, 1975.
- 7) Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG: Sliding of the epithelium in experimental corneal

- wounds. Invest Ophthalmol 15: 4—14, 1976.
- 8) 北野周作：角膜の創傷治癒について。眼紀 29: 1341—1358, 1978.
 - 9) 眞鍋礼三, 西田輝夫：フィブロネクチン。眼紀 33: 2136—2142, 1982.
 - 10) **Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H, Manabe R**: Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo. Arch Ophthalmol 102: 455—457, 1984.
 - 11) **Hoffmann F**: The surface of epithelial cells of the cornea under the scanning electron microscopy. Ophthalmol Res. 3: 207—214, 1972.
 - 12) **Hoffmann F, Schweichel JU**: The microvilli structure of the corneal epithelium of the rabbit in relation to cell function. Ophthalmic Res. 4: 175—184, 1872.
 - 13) **Pfister RR, Burstein N**: The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: A scanning electron microscope study. Invest. Ophthalmol. 15: 246—259, 1976.
 - 14) **D'Amico DJ, Capser-Velu L, Libert J, Shanks E, Schrooyen M, Hanninen LA, Kenyon KR**: Comparative toxicity of intravitreal aminoglycoside antibiotics. Am. J. Ophthalmol 100: 264—275, 1985.
 - 15) 石橋康久, 松本雄二郎：日本における角膜真菌症。眼科 25: 645—650, 1983.
 - 16) **Jones BR**: Principles in the management of oculomycosis. Am. J. Ophthalmol 79: 392—404, 1972.
 - 17) **Foster CS, Lass JH**: Ocular toxicity of topical antifungal agents. Arch. Ophthalmol 99: 1081—1084, 1981.
 - 18) **Rucker I, Kettrey R, Bach F, et al**: A safety test for contact lens wetting solutions. Evaluation of commercially available solutions. Ann Ophthalmol 4: 1000—1006, 1972.
-