

眼球冷却下における眼手術に関する実験的研究 (第2報)

低温の眼内灌流液の影響 (図11, 表3)

本多 文夫・馬嶋 昭生・玉井 一司 (名古屋市立大学医学部眼科学教室)

The Local Cooling Effect on the Eyeball of Intraocular Irrigating Solution

Fumio Honda, Akio Majima and Kazushi Tamai

Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

要 約

10°Cおよび30°Cに保った S-MA₂ (千寿製薬) を用いて前房内を灌流し, 低温灌流液の家兎角膜, 虹彩, 毛様体に及ぼす影響について検討した。2時間前房内を灌流した際, 角膜内皮細胞には specular microscope による観察では異常は認められなかった。2時間灌流後の角膜膨潤率は10°C灌流群で $18.4 \pm 8.5 \mu\text{m/hr}$ を示し, 30°C灌流群の $7.4 \pm 2.9 \mu\text{m/hr}$ と比べて有意に増加した。10°C灌流群と35°C灌流群の間には灌流中の瞳孔の大きさに有意な差は認められず, 灌流後の組織変化も顕著な差はみられなかった。(日眼 91:794-800, 1987)

キーワード: 眼球冷却, 前房内灌流, 人工房水 (S-MA₂), 角膜厚, 角膜内皮

Abstract

Irrigation with simulated aqueous humor (S-MA₂) of the rabbit anterior chamber was conducted to evaluate the cooling effect on the cornea, iris and ciliary body. The temperature of S-MA₂ was maintained at 35°C or 10°C for two hours of irrigation. Central endothelial photographs were attained with a specular microscope preoperatively and after irrigation. The size of the individual endothelial cell was analyzed by a computerized digitizer. The corneal thickness at its center and the pupil size during irrigation were also measured. No morphological changes in the endothelial cell were detected in any eye throughout irrigation. The pupil size was unaffected by irrigation for two hours at 10°C or 35°C. From long-term observation for four weeks after irrigation, the endothelial cell density remained unchanged. The corneal thickness at 10°C ($18.4 \pm 8.5 \mu\text{m/hr}$) significantly increased as compared with that at 35°C ($7.4 \pm 2.9 \mu\text{m/hr}$). According to the light microscopic study after irrigation, the iris stroma, iridial processes and ciliary processes became edematous, and the capillaries in the iridial processes and ciliary processes were dilated and engorged. There was no detectable difference in the extent of these histological changes between eyes irrigated at 10°C and 35°C. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 794-800, 1987)

Key words: Eyeball cooling, Anterior chamber irrigation, Simulated aqueous humor (S-MA₂), Corneal thickness, Corneal endothelium

別刷請求先: 467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 本多 文夫

Reprint requests to: Fumio Honda, M.D. Dept. of Ophthalmol., Nagoya City Univ. Medical School 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

(昭和62年4月2日受付) (Accepted April 2, 1987)

I 緒 言

低温は古くから医学領域において利用され、さまざまな分野で役立っている。しかし、眼科領域で眼球を冷却下におき手術を施行した場合、眼での創傷治癒や組織反応などにいかなる影響があらわれるかについては検討されていない。著者らは前報¹⁾で、眼球表面を冷却して眼組織に及ぼす影響について報告したが、今回は、眼内手術に使用される灌流液を用いて眼内を冷却する方法を試みた。

眼内灌流液の研究はこれまで数多くの実験がおこなわれてきたが、多くは角膜に対する影響をみたものであり、実験方法としては、Diksteinら²⁾³⁾が考案した dual chamber specular microscope で観察できる角膜内皮灌流法が多く使用されている。眼内灌流液は眼内各組織と接触するため各組織に対して障害が少ないものでなくてはならない。したがって角膜だけではなく、虹彩、毛様体などの影響についても検討することが重要であり、著者らは *in vivo* で前房内を灌流する実験モデルを作成した。眼内灌流液の組成によって組織障害の程度が異なることはすでに報告²⁾⁴⁾⁵⁾されているが、灌流液の温度についての検討は、あまりおこなわれていない。そこで、本研究では低温の眼内灌流液を用いて眼内を低温にし、眼組織にどのような影響を及ぼすか検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験モデル作製

実験動物は体重2.5~3.0kgの成熟雌性白色家兎5羽10眼を用いた。Pentobarbital (20mg/kg)の静注とKetamine (1mg/kg)の筋注による全身麻酔下で家兎を固定台に固定した。瞬膜を切除後、12時部位の強角膜輪部近くの上強膜に黒1号絹糸で制御糸をかけ、21 gage(G)を10時の部位、23G針を2時の部位の強角膜輪部から前房内に刺入した。灌流液にはS-MA₂(千寿製薬)を使用し、S-MA₂の入った容器をスタンドにつるし、容器とつながった輸液用の tubing set と長さ4mのポリエチレンチューブを接続し、その中に灌流液を流し、そのチューブの先に21G針を接続した。また23G針は吸引のためマイクロポンプ(東洋製作所 MODEL TMP-15E)の吸引用チューブと接続し、前房内に刺入した針が虹彩、角膜内皮、水晶体に触れない様に固定し、図1の様に前房内を灌流した。灌流速度は2.5ml/min、眼圧は20mmHgの条件に設定し、長さ

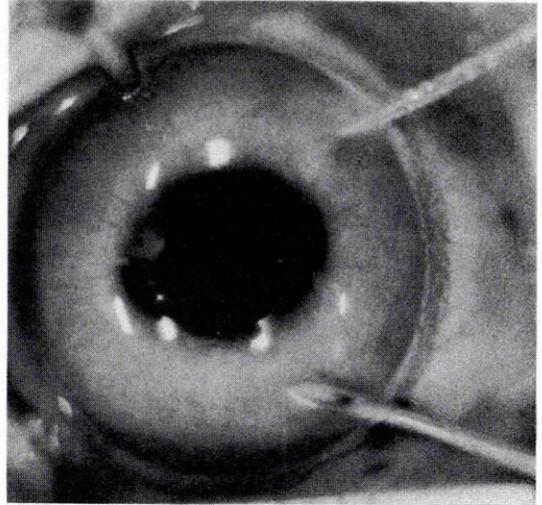


図1 21G針と23G針を前房内に刺入し、10℃のS-MA₂で灌流する。

表1 使用したS-MA₂の組成 (mM/l)

成分	S-MA ₂
Na Cl	112.90
K Cl	4.83
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.23
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.22
NaHCO ₃	25.00
Na citrate·2H ₂ O	3.40
Na acetate·3H ₂ O	4.41
Glucose	8.33
Osmolarity (mOsm)	298
pH	7.3

4mのポリエチレンチューブを適時温水で暖めたり氷で冷却したりして灌流液の温度をかえ、実験群を35℃灌流群5眼と10℃灌流群5眼にわけ、2時間前房内を灌流した。

実験に用いたS-MA₂の化学組成、浸透圧およびpHを第1表に示す。

2. 検討項目

(1) 角膜内皮細胞の撮影と面積の測定

Specular microscope (Bio-optic社)を用い、灌流前、灌流開始1時間後、2時間後、2時間灌流後1週

間、および4週間に角膜中央部の内皮細胞を観察し写真撮影した。Standard scaleとしてThomaの赤血球計算板の0.05mmの格子を使用し、内皮細胞を撮影した状態のままのfocusで撮影した。フィルムはKodak Tri-Xを用い、最終倍率800倍に引伸した角膜内皮写真からdigitizer(武藤工業社Bitpad-ONE)とマイクロコンピュータ(DEC社PDP11/23)を用いて灌流前、灌流後1週間、4週間の角膜内皮細胞個々の面積および平均値と標準偏差を計算した。細胞面積は μm^2 で表現した。

(2) 角膜の厚さの測定

灌流直前、灌流開始後30, 60, 90および120分の角膜中心部の厚さを測定した。使用周波数20MHzのcorneoscanner ultrasonic pachymeter (stortz社)を使用し、角膜の厚さはデジタル表示で1/1,000mmまで計測でき、各時間毎に5回測定を行ない、その平均値を求めた。各実験群について角膜の厚さの時間変化に対し回帰直線を算出し、角膜の膨潤率を求めた。

(3) 瞳孔面積の測定

実験室を準暗室として、アサヒペンタックスSPFを固定台に固定し、倍率1×で瞳孔面とカメラレンズの光軸が垂直になるように留意して撮影した。フィルムはFujichrome P-1600Dを用いて瞳孔撮影は灌流直前、灌流開始後15, 30, 60および120分に行った。瞳孔面積の測定は、同一条件で撮影したスケールを基準として、拡大プリント(6倍)から前述のdigitizerとマイクロコンピュータを用いて、各時間毎に2回測定を行ない、その合計の平均値と標準誤差を求めた。瞳孔面積は mm^2 で表現した。

(4) 光学顕微鏡所見

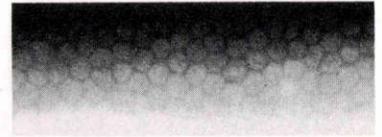
35℃と10℃の温度に保ったS-MA₂でそれぞれ2時間前房内灌流直後、直ちに眼球を摘出し、2.5%グルタルアルデヒド、5%ホルマリン混合液(pH7.2, 0.15Mリン酸緩衝液)で固定した。眼球赤道部で眼球を半切してパラプラストに包埋し、連続切片標本を作製してヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

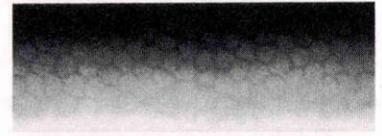
1. Specular microscopeによる角膜内皮細胞の観察

35℃と10℃で灌流した時の灌流開始1時間、2時間後、2時間灌流後1週間、4週間の角膜内皮細胞の観察結果をそれぞれ図2, 3, 4, 5に示す。35℃, 10℃の

灌 流 前



灌 流 1 時 間



灌 流 2 時 間



— 50 μm

図2 35℃で灌流した時の角膜内皮の経時的変化

灌 流 前



灌 流 1 時 間



灌 流 2 時 間



— 50 μm

図3 10℃で灌流した時の角膜内皮の経時的変化

いずれでも各時期における角膜内皮細胞は六角形のモザイク模様を呈し、細胞の輪郭は明瞭に認められ、灌流前と比べて内皮細胞の形に著しい差はみられなかった。

35℃灌流群と10℃灌流群の角膜内皮平均細胞面積の平均値と標準偏差は灌流前で $321.3 \pm 44.7 \mu\text{m}^2$ と $278.7 \pm 31.6 \mu\text{m}^2$ であり、灌流後1週間、4週間と比べて、両群とも有意な差は認められなかった(表2, 表3)。

2. 角膜の厚さの変化

35℃と10℃で灌流した時の角膜の厚さの経時的変化

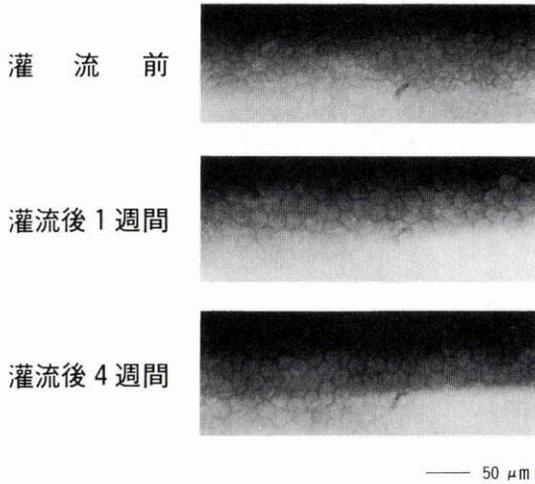


図4 35°Cで灌流後4週間までの角膜内皮像

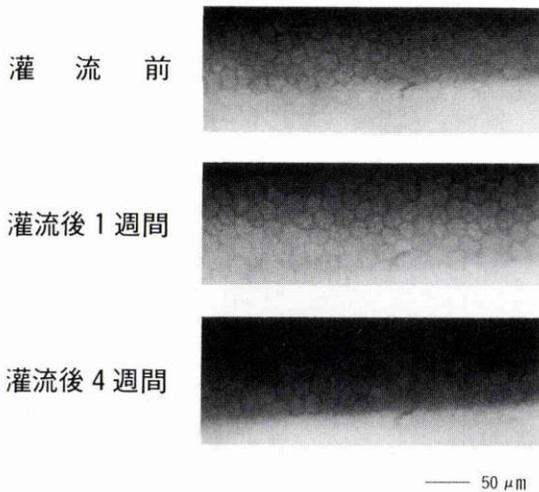


図5 10°Cで灌流後4週間までの角膜内皮像

を図6, 7に示す。角膜の厚さの変化は灌流90分において35°Cで $15.6 \pm 2.6 \mu\text{m}$, 10°Cで $36.8 \pm 11.2 \mu\text{m}$ 灌流120分において35°Cで $20.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$, 10°Cで $43.4 \pm 9.4 \mu\text{m}$ でいずれも35°C灌流群と10°C灌流群の間で有意差が認められた(t検定, 90分; $p < 0.05$, 120分; $p < 0.01$)。回帰直線から求めた角膜膨潤率は35°C灌流群では $7.4 \pm 2.9 \mu\text{m/hr}$ (平均値±標準誤差), 10°C灌流群では $18.4 \pm 8.5 \mu\text{m/hr}$ であった。

3. 瞳孔の面積の変化

35°Cと10°Cで灌流した時の瞳孔の面積の経時的変化を図8, 9に示す。灌流直前の瞳孔面積は35°C灌流群で $24.3 \pm 7.3 \text{mm}^2$ (平均値±標準誤差), 10°C灌流群で $26.9 \pm 3.7 \text{mm}^2$ であり, 有意差はみられなかった。両群

表2 35°C灌流群の灌流後4週間までの角膜内皮細胞平均面積 (μm^2)

家兔(番号)	灌流前	灌流後1週間	灌流後4週間
(1)	276.6±38.3	274.1±27.9	276.1±31.2
(2)	338.7±34.5	341.3±38.8	334.0±47.1
(3)	320.5±34.9	313.6±32.9	319.7±35.3
(4)	347.0±35.7	346.0±40.4	360.0±41.4
平均±S.D.	321.3±44.7	320.4±45.4	322.6±49.6

表3 10°C灌流群の灌流後4週間までの角膜内皮細胞平均面積 (μm^2)

家兔(番号)	灌流前	灌流後1週間	灌流後4週間
(1)	267.5±27.4	264.4±25.9	272.8±37.3
(2)	280.8±23.5	274.8±29.5	281.0±30.9
(3)	265.4±28.8	260.3±29.8	272.6±31.7
(4)	298.7±32.9	309.2±33.2	301.5±37.2
平均±S.D.	278.7±31.6	277.9±35.8	281.8±35.6

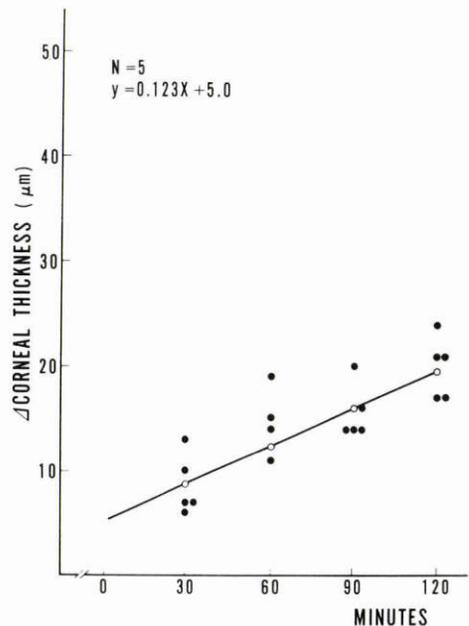


図6 35°C灌流群における角膜の厚さの経時的変化

いずれにおいても瞳孔径は, 灌流直前に比べ灌流15分から30分後にかけて大きくなる傾向があるが, 灌流直

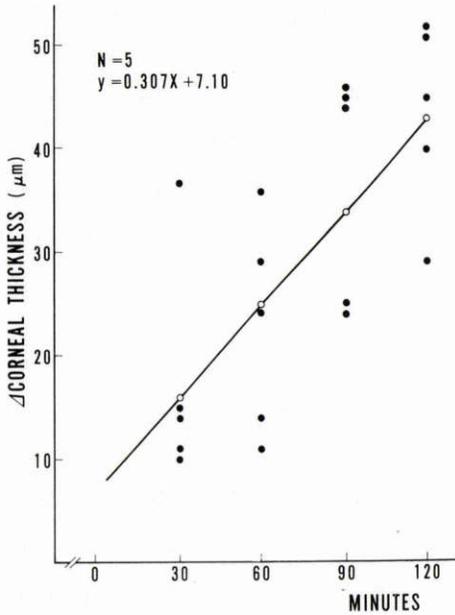


図7 10℃灌流群における角膜の厚さの経時的変化

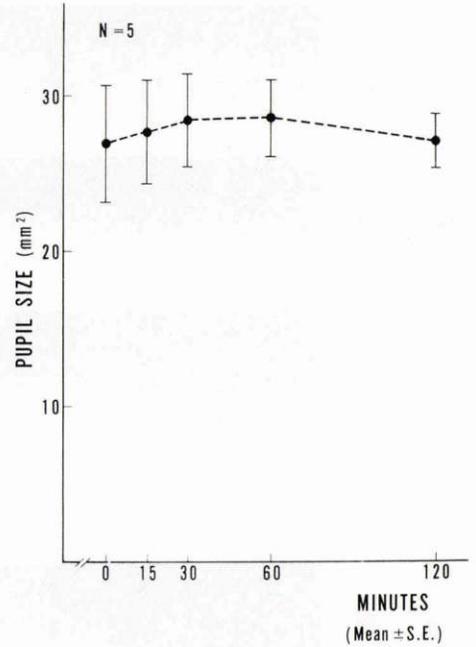


図9 10℃灌流群における瞳孔面積の経時的変化

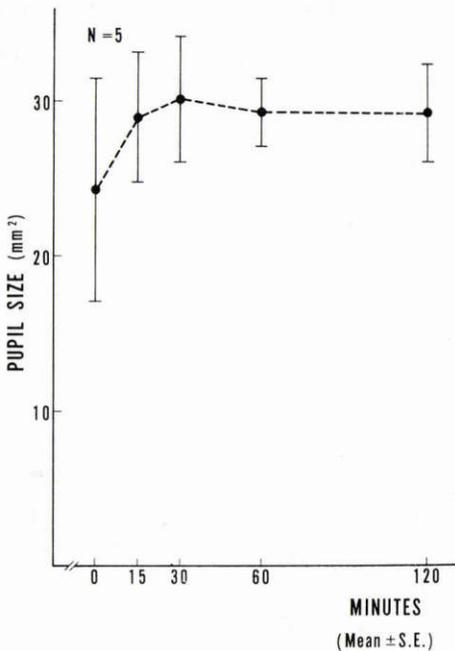


図8 35℃灌流群における瞳孔面積の経時的変化

前と灌流120分の瞳孔面積を比べると有意差はみられなかった。また両群の間には各時間において有意差は認められなかった。

4. 光学顕微鏡所見

35℃灌流眼と10℃灌流眼のH・E染色標本では、い



図10 35℃で2時間前房灌流直後の組織像。H・E染色, ×50, iridial processに著明な実質の腫脹と血管拡張がみられる。

ずれにも虹彩, 毛様体の血管が拡張し特に iridial process, ciliary processに強い実質の腫脹と血管拡張, うっ血が認められた。また前後房内の虹彩表面に所々フィブリンが折出している像もみられた。角膜, 強膜には光顕的には異常は認められなかった。これらの組織所見は, 35℃と10℃で灌流したものいづれにもみられ, 程度に差はなかった(図10, 図11)。

IV 考 按

灌流中の角膜障害の程度の差は灌流液の組成による

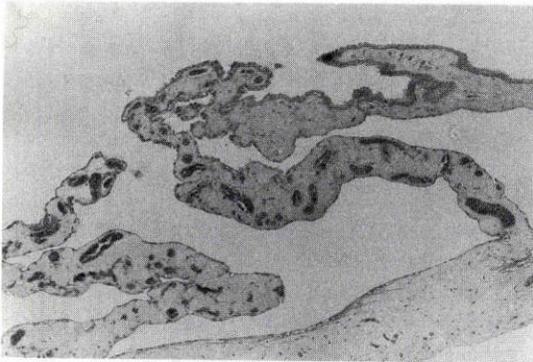


図11 10℃で2時間前房灌流直後の組織像。H・E染色，×50，35℃で灌流した場合と同程度に実質の腫脹と血管拡張が iridial process にみられる。

ところが大きいので、著者らは、灌流液に細胞間の接着装置の維持に必要な $Ca^{2+5)}$ 、角膜内皮のポンプ機構維持に必要な $HCO_3^{6)}$ 、エネルギー源である Glucose⁷⁾ などを含み、現時点で最も優れているものの一つと考えられる S-MA₂ を使用した。このようにして灌流液による障害も少なくして、できるだけ低温のみによる影響を調べた。

内眼手術中におこなわれる操作により角膜内皮細胞が障害され、術後内皮細胞の数が減少し、内皮細胞平均面積が増大してくることはよく知られている⁸⁾。前房内の灌流・吸引は白内障手術中におこなわれる手術操作の1つで、その角膜障害については Binder ら⁹⁾ が検討し、電顕的に角膜内皮細胞がびまん性に浮腫状になり、細胞の破壊がみられたことを報告している。また榎本ら¹⁰⁾ は、*in vitro* で灌流3時間後の角膜内皮細胞を走査電子顕微鏡的に観察したところ、灌流液の温度が37℃のもの比べて20℃の場合の方が、内皮細胞浮腫が著明に認められたことを報告している。このように角膜内皮細胞が障害を受けた場合、細胞の分裂によるものと細胞の拡大と移動による創傷治癒機転を持っていることがわかってきた¹¹⁾。著者らが観察した角膜内皮は、主に角膜中央部分であることと、家兎の角膜内皮細胞はヒトと違って分裂能が高く、内皮修飾は主として細胞分裂によっておこなわれること¹¹⁾を考慮すると、specular microscope による観察では、異常がみられなかったが、これだけでは詳細な角膜内皮障害の程度は判定できないと思われる。

三島¹²⁾ は角膜の厚さと温度との関係について、低温によって角膜が膨潤するのは角膜内皮層の能動機能が阻害されるためと述べている。角膜の実質は本来膨潤

しようとする力、すなわち swelling pressure があり、角膜内皮層には barrier 機能と能動機能が存在しこれらが同時に働き角膜の厚さを一定に保つため pump-leak mechanism が働いていると考えられている¹³⁾。一般には pumping activity が減少すれば leak が優勢になり、pumping activity の阻害度に比例して角膜が膨潤してくる。したがって低温によって角膜が膨潤するのは pumping activity が阻害されるためと考えられる。*in vivo* ではいままで角膜内皮を実際十分に冷却して温度を低下させる良い方法がなく、低温にすると角膜が膨潤する現象がうまく証明されなかった。しかし McCarey ら¹⁴⁾ は、水で冷却した生理食塩水を家兎の角膜表面にのせたコンタクトレンズの中に流す方法により、角膜内皮を約8℃まで低下させ、30μm/hr の角膜膨潤率を示し、temperature reversal の現象も確認している。著者らの10℃の眼内灌流液を用いて前房内を低温にする方法でも18.4±8.5μm/hr の角膜膨潤率を示した。もちろんこの角膜膨潤率は灌流液である S-MA₂ の影響もあるが、35℃の場合と比べて明らかに膨潤しているのも、*in vivo* においても前房内を10℃前後の低温にすると角膜が明らかに膨潤してくることがわかった。また10℃で灌流した時に、35℃の場合に比べて角膜の厚さの測定値にばらつきがあるのは、10℃で前房内を灌流しても、*in vivo* では灌流中いつも前房内が均一な温度に保たれていないためと考えられる。

眼内手術において術中、散瞳を維持する必要がある場合、眼内操作特に前眼部手術操作により縮瞳反応がおこってくる¹⁵⁾。また前房灌流そのものの刺激や灌流液の組成のちがいにより血液房水柵の破壊が異なることも報告されている¹⁶⁾。著者らの実験で灌流直前から灌流15分、30分後にかけてやや瞳孔径が増したのは、眼圧を20mmHg と正常よりやや高く設定したために、前房が深くなり前後房の圧の均衡を保つために瞳孔径が変化したものと考えられる。また低温、高温いずれでも灌流直前と比べて瞳孔径の有意な変化は灌流120分まで観察されず、両群においても有意差は認められなかった。したがって S-MA₂ を灌流液に用いて10℃まで低温にしてもその刺激だけでは縮瞳反応には影響ないと考えられる。しかし、鈴木ら¹⁷⁾ はウシ摘出瞳孔括約筋の反応と chamber の液温の変化について検討し、低温によりプロスタグランジンが関与していると考えられる縮瞳がおこることを示し、Bucu ら¹⁸⁾ は角膜表面を冷凍して、虹彩の温度を0℃から10℃の間まで低下させた場合前房内房水蛋白濃度の有意な上昇が認め

られ、低温により血液房水柵の破壊がおこることを報告している。したがって10°Cよりさらに低温にした場合、血液房水柵の破壊がつよくおこり、縮瞳反応がおこってくる可能性は十分あると考えられる。著者らは、前報¹⁾において、血液房水柵の破壊を光顕的に検索し、灌流後の組織所見は前房穿刺眼の組織所見と同様な変化を認めた。また、光顕的レベルでは前房内を低温にしてもその組織学的変化には差は認められず、温度による影響はみられなかった。

眼内では角膜、毛様体、水晶体などいろいろな組織で能動輸送に関与する酵素や解糖系に関与する酵素などさまざまな酵素が存在し、眼組織の機能維持に対して重要な働きをしている。一般に低温にすると酵素活性の低下、組織代謝の抑制がおこってくる。著者らの実験で前房内が冷却されて十分組織代謝が抑制され、角膜が膨潤することがわかった。眼科手術において、低温にして組織代謝を抑制することを利用したものは、角膜移植術に用いられる角膜の保存法が一般的であるが、手術中の操作、術後の組織障害に対して、組織代謝を抑制することが、いかなる影響を及ぼすかは明らかではないので今後さらに検討していきたい。

本研究は文部省科学研究費補助金奨励(A) No. 61771371による援助を受けた。

本論文の要旨は昭和61年1月31日第9回日本眼科手術学会で講演した。

文 献

- 1) 本多文夫, 馬嶋昭生, 鈴木 敬, 山田一義: 眼球冷却下における眼手術に関する実験的研究(第1報). 日眼 90: 665—670, 1986.
- 2) **Dikstein, S. and Maurice, D.M.:** The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J. Physiol* 221: 29—41, 1972.
- 3) **McCarey BE, Edelhofer HF, Van Horn DL:** Functional and structural changes in the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol* 12: 410—417, 1973.
- 4) **Edelhofer HF, Gonnering R, Van Horn DL:** Intraocular irrigating solutions. A comparative study of BSS plus and lactated Ringer's solution. *Arch Ophthalmol* 96: 516—520, 1978.
- 5) **Kaye GI, Mishima S, Cole JD, Kaye NW:** Studies on the cornea. VII. Effects of perfusion with a Ca free medium on the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol* 7: 53—66, 1980.

- 6) **Hull DS, Green K, Boyd M, Wynn HR:** Corneal endothelium bicarbonate transport and the effect of carbonic anhydrase inhibitors on endothelial permeability and fluxes and corneal thickness. *Invest Ophthalmol* 16: 883—892, 1977.
- 7) **Maurice DM:** The corneal and sclera. *The Eye*, 3rd, IB 95—97, Academic Press. New York and London, 1984.
- 8) **Rao GN, Shaw EL, Arthur E:** Morphological appearance of the healing corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 96: 2027—2030, 1978.
- 9) **Binder PS, Sternberg H, Wickham MG, Worthen DM:** Corneal endothelial damage associated with phacoemulsification. *Am J Ophthalmol* 82: 48—54, 1976.
- 10) 榎本善収, 倉淵信哉, 金川龍一, 嶋美穂: 眼内灌流液温度の角膜内皮に及ぼす影響. 眼紀 37: 499—502, 1986.
- 11) **Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ:** Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 16: 597—613, 1977.
- 12) 三島清一: 角膜内皮細胞層の生理と病理. 日眼 77: 1736—1759, 1973.
- 13) **Maurice DM:** The cornea and sclera. *The Eye*, 3rd ed, IB 85—86, Academic Press. New York and London, 1984.
- 14) **McCarey B, Jumblatt MM, Maurice DM:** Cold swells the rabbit cornea in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci ARVO Suppl* 162, 1979.
- 15) **Michels RG:** Postoperative management and complications, *Vitreous Surgery*. 390, The CV Mosby Co, London, 1981.
- 16) 三宅謙作, 朝倉当子: 前房灌流および灌流液と血液房水柵. 眼紀 33: 842—845, 1982.
- 17) 鈴木 亮, 芳野秀晃, 寺西秀人, 小林俊策: 前房灌流時の縮瞳反応, 特に温度への影響について. 臨眼 40: 597—598, 1986.
- 18) **Bucu P, Van Horn DL, Schutten WH, Cohen K:** Effects of transcorneal freezing on protein content of aqueous humor and intraocular temperature in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1199—1202, 1978.