各種手術用眼内潅流液の角膜内皮バリアー機能及び角膜膨潤速度に及ぼす影響（図1，表7）

新家　真・江口秀一郎・松元　俊〔東京大学医学部眼科学教室　主任：増田寛次郎教授〕

The in vitro Effects of Intraocular Irrigating Solutions on the Barrier Function of the Corneal Endothelium and the Corneal Swelling Rate

Makoto Araie, Shuichiro Eguchi and Shun Matsumoto

Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

要　約

現在本邦で入手可能な，又は将来市販の可能性のある，3種の手術用眼内潅流液，BSS(アルコン)，S-MA_2(千寿製薬)，BOS（科研製薬）の，角膜内皮バリアー機能と，角膜膨潤速度に及ぼす影響を，Glutathione-Bicarbonate-Ringer（GBR）を対照として，家兎眼で比較検討した．内皮バリアー機能の定量的指標，Carboxyfluoresceinの内皮透過性（$\times 10^{-4}$cm/分）は，S-MA_2潅流下で4.83±0.56（SD，N＝7）と，他眼角膜をGBRで潅流しての値，3.88±0.70より有意に($p<0.005$)高かったがGBR-BSS，GBR-BOS及びGBR(左眼)-GBR（右眼）間では有意差をみなかった．潅流下の角膜膨潤速度（μm/時）はGBR：9±2，S-MA_2：40±1，BSS：40±8，BOS：17±2（SD，N＝4）と，BSS＝S-MA_2＞BOS＞GBRの順に有意差（$p<0.005$）が見られた．（日眼　92：127—132，1988）

キーワード：眼内潅流液，角膜内皮バリアー機能，角膜膨潤速度

Abstract

We studied the in vitro effect of 4 intraocular irrigating solutions—a glutathione bicarbonate Ringers solution (GBR), a commercially available citrate-acetate glucose bicarbonate solution (S-MA_2), a phosphate buffered glucose bicarbonate dextran solution (BOS) and a balanced salt solution (BSS) on the barrier function of the corneal endothelium and the corneal swelling rate. Isolated rabbit corneas were mounted in a dual-chambered specular microscope and the endothelium was perfused. To estimate the barrier function, the endothelial permeability coefficient to carboxyfluorescein (P_{ac}) was determined. Between paired corneas perfused with GBR and BOS or GBR and BSS, there was no significant difference in the P_{ac}, while a significant difference in this factor was seen between the paired corneas perfused with GBR and S-MA_2 (paired t-test, $p<0.005$), the P_{ac} was 4.83±0.56 ($\times 10^{-4}$ cm/min) for S-MA_2 and 3.88±0.70 ($\times 10^{-4}$cm/min) for GBR (Mean±SD, N=7). The corneal swelling rate was 9±1μ/hr for GBR, 40±1μ/hr for S-MA_2, 40±8μ/hr for BSS and 17±2μ/hr for BOS (Mean±SD, N=4), the difference between GBR and BOS, BOS and BSS or BOS and S-MA_2 was significant (unpaired t-test, $p<0.005$), while it was not significant between BSS and S-MA2. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 127—132, 1988)

別刷請求先：113　東京都文京区本郷7－3－1　東京大学医学部眼科学教室　新家　真　（昭和62年7月24日受付）

Reprint requests to：　Makoto Araie, M.D.　Dept. of Ophthalmol., School of Med., Univ. of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan
(Accepted July 24, 1987)

Key words: Intraocular irrigating solution, Corneal endothelium, Barrier function, Corneal swelling rate

I 緒　言

眼内潅流液は，現在眼科手術にとって欠く事のできぬ物であり，手術時，用いられる眼内潅流液が，眼組織，特に角膜内皮細胞に障害を与えぬという事が極めて重要となる．最近著者の1人は，現在購入可能な，2種類の眼内潅流液 BSS-Plus(Alcon Lab. Inc. Fort Worth, Texas)，S-MA$_2$(オペガード®，千寿製薬株，大阪)，及び，標準的な角膜内皮潅流液である gluthathione-bicarbonate-Ringer (GBR) の角膜内皮バリアー機能に及ぼす影響を In vitro で検討した所，S-MA$_2$で45分間内皮側を潅流した場合のカルボキシフルオレセインに対する透過性は，BSS-Plus 及び GBR で潅流した場合の透過性に比べて，約20%高く用いた内皮透過性測定法が極めて潅流液の安全性検討に有用である事を示した．故に，現在既に使用されている，及び使用されようとしている，他の眼内潅流液を，同様方法で検討する事は，意義ある事と考えられた．

今回，我々は依然として世界的に広く使用されている Balanced Salt Solution(BSS®, Alcon Lab. Inc. Fort Worth, Texas)[2)3)]，及び内皮障害の少く且安定な新しい眼内潅流液として日本で開発された Phosphate-buffered-glucose bicarbonate dextran Solution (BOS と略称，科研製薬株，東京)[4)]での角膜内皮潅流下に於ける内皮バリアー機能と角膜の厚さに及ぼす影響を GBR をコントロールとして検討した．

更に，その結果を，今回 S-MA$_2$潅流下で再測定した角膜内皮バリアー機能と角膜膨潤速度と比較した．

II 対象と方法

1：眼内潅流液

BSS，S-MA$_2$(オペガード®)は市販の物を新しく購入して使用した．BOS 製剤は科研製薬株，より提供をうけた．GBR は常に実験の直前に調整して使用した．各潅流液の組成は表1に示した．

表1　各種溶液の組成 (mM/l)

	BSS	S-MA$_2$	GBR	BOS
NaCl	109.5	112.9	115.0	107.9
KCl	10.1	4.8	5.3	4.8
$CaCl_2$	3.3	1.2	0.7	1.0
$MgSO_4$		1.2	0.6	0.8
$MgCl_2$	3.2			
$NaHCO_3$		25.0	30.0	25.0
Glucose		8.3	5.0	7.5
Adenosin			1.0	
Red. Glutathione			1.0	
Na Acetate	28.7	4.4		
Na Citrate	5.8	3.4		1.7
Na Lactate				
K_2HPO_4			1.0	
NaH_2PO_4				8.0
Na_2HPO_4				6.0
Dextran 70 (%)				2.0
Osmolality	270.0	286.0	286.0	289.0
pH	7.1	7.2	7.5	7.2

2：内皮バリアー機能の定量

1) 実験動物及び実験条件

1% 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) 水溶液 (pH 7.3, 290mOsm)を，実験開始前に調整した[1)]．2.3～3.3 kg の白色家兎を，ペントバルビタール過量投与にて屠殺し，両眼球を摘出，角膜上皮を剝離後，Maurice 等の方法に準じて，Specular microscope 下の角膜潅流装置にマウントし，上皮側をシリコンオイル(20cs, 信越化学，株)[5)]でおおった．両眼角膜を常に同時に実験し，7対は両角膜とも GBR で，他の21対は片眼を GBR，他眼を BSS，BOS 又は S-MA$_2$で潅流した．なお GBR の浸透圧は常に他眼を潅流する溶液のそれら (BSS : pH 7.1, 270mOsm ; BOS : pH 7.2, 289mOsm ; S-MA$_2$: pH 7.2, 286mOsm) と等しくなるように実験開始前に NaCl により調整し測定した (Digimatic Osmometer® Model 3DII, Advanced Instruments Inc, Mass, USA)．

潅流速度及び温度は，27μl/分及び37℃であり，マウント終了後約10分で，角膜厚さを，Specular microscope 下で測定，15分の時点で，シリコンオイルを除去し，CF 溶液を10秒間角膜実質と接触させた．その後 CF 溶液を充分に且速やかに吸引し，シリコンオイルで角膜をおおい，CF との接触後10, 20, 30分後に角膜厚さを測定した．30分時点で，人工前房中の潅流液を全て空気注入により採取し，CF との接触後連続的に採取されてきた潅流液と混合して，中に含まれている CF 量 (m_p) を蛍光測光器 (F-3000分光蛍光光度計，日立製作所，東京) にて定量した．又角膜中に残存する

CF量（m_c）は，20ccのリン酸緩衝液中に角膜を48時間，4℃で浸す事により，角膜中のCFを緩衝液中に流出させた後，同様に測定した．

2）角膜内皮透過性の算出方法

内皮のバリアー機能の定量指標である，CFの内皮透過性（P_{ac}）は以下の如く算出された[1)6)]．

$$m_c=(m_c+m_p)\exp(-k_{c.ca}\cdot t)\cdots\cdots(1)$$

$$P_{ac}=k_{c.ca}r_{ca}q\cdots\cdots(2)$$

$k_{c.ca}$は，CFの房水—角膜移行係数；r_{ca}は角膜—房水分配係数（1.29）[7)]，qは角膜厚さtは時間である．qは，10, 20, 30分の測定値の平均を算出し，更にSilicone oilと角膜との屈折率の違いを補正するため，それに0.91をかけたものを使用した[1)]．

tとしては30分よりCFが角膜を通過する時間をひいた25.5分を用いた[8)]．

3：角膜膨潤速度

2と同様方法で白色家兎の眼球を摘出し，角膜上皮を剝離しないでperfusion chamberに固定した以外は，前記と同様条件下で，4時間流した[5)]．30分，1，2，3，4時間目に角膜の厚さを，Specular microscopeの内皮側と上皮側にピントをあわせるのに用いた目盛の差より測定，その5回の平均値をもってその時点での角膜厚さとした．角膜膨潤速度は，個々の角膜における厚さの時間変化に回帰直線をあてはめ，その傾きより算出した．

4：カルシウムイオン濃度測定

各々の潅流液中のカルシウムイオン濃度を，カルシウムイオン電極（Model 8203-06T，堀場製作所，京都）にて，20℃にて測定した．GBRは新しく作製した直後，BOS，S-MA_2，BSSは開栓した直後に，各々5サンプルについて測定した．

III 結　果

1）内皮バリアー機能の定量（表2～5参照）

GBR（左眼）—GBR（右眼），GBR-BOS間では，潅流中の角膜厚さ，総CF投与量（m_c+m_p），$m_p/(m_c+m_p)$比，P_{ac}等全てのparameter値間に有意差をみなかった（表2及び4）．又GBR，BOSで潅流された角膜では，CF溶液接触後10，20，30分の時点に於ける角膜厚さに有意差をみなかった．

GBR-S-MA_2間では，総CF投与量，潅流中角膜厚さには，両者間で差をみなかったが，$m_p/(m_c+m_p)$比，P_{ac}はS-MA_2で潅流された側で有意に高く（paired t-test，$p<0.005$）又それらのS-MA_2/GBR比，1.22±0.15（N=7，SD），1.27±0.17（N=7，SD）はGBRで潅流した内皮の左右比1.02±0.15，1.03±0.17より各々有意に高かった（Unpaired t-test，$p<0.025$）（表3）．

表2　左右角膜をGBR潅流下の角膜内皮透過性測定結果．

	GBR（右眼）	GBR（左眼）
m_c（μg）	4.98± 0.44	4.87± 0.34
m_p（μg）	1.18± 0.17	1.16± 0.14
$m_p/(m_c+m_p)$	0.19± 0.03	0.19± 0.03
同左右比	1.02±0.15	
角膜厚さ（μm）	371 ±10	374 ±15
P_{ac}（$\times10^{-4}$/分）	3.71± 0.56	3.76± 0.50
同左右比	1.03±0.17	
Osmolality（mOs）	286 ± 4	286 ± 4

m_c：実験終了時角膜に残存した色素量，
m_p：潅流液中に移行した色素量，
P_{ac}：角膜内皮透過性係数，
Osmolalityは各々溶液の実験開始直前測定値．
平均±SD，N=7．

表3　片眼角膜GBR，片眼角膜S-MA_2潅流下の，角膜内皮透過性測定結果．

	GBR	S-MA_2
m_c（μg）	5.45±0.83	5.25± 0.83
m_p（μg）	1.19±0.17	1.45± 0.24
$m_p/(m_c+m_p)$	0.18±0.03	0.22± 0.02**
S-MA_2/GBR比	1.22±0.15*	
角膜厚さ（μm）	379 ±8	388 ±27
P_{ac}（$\times10^{-4}$/分）	3.88±0.70	4.83± 0.56**
S-MA_2/GBR比	1.27±0.17*	
Osmolality（mOsm）	287 ±2	286 ± 1

* Unpaired t-test，$p<0.025$（表2の値との比較）
** paired t-test，$p<0.005$
略号については表2参照．平均±SD，N=7．

表4　片眼角膜GBR—片眼角膜BOS潅流下の角膜内皮透過性測定結果

	GBR	BOS
m_c（μg）	5.03± 0.40	5.04± 0.43
m_p（μg）	1.13± 0.20	1.13± 0.30
$m_p/(m_c+m_p)$	0.19± 0.02	0.18± 0.04
BOS/GBR比	0.97±0.21	
角膜厚さ（μm）	379 ±28	365 ±23
P_{ac}（$\times10^{-4}$/分）	3.93± 0.45	3.67± 0.84
BOS/GBR比	0.95±0.26	
Osmolality（mOsm）	288 ± 2	289 ± 1

略号については表2参照，平均±SD，N=7．

表5　片眼角膜GBR—片眼角膜BSS潅流下の角膜内皮透過性測定結果.

	GBR	BSS
m_c (μg)	5.10± 0.90	4.62± 0.31
m_p (μg)	1.20± 0.38	1.07± 0.17
$m_p/(m_c+m_p)$	0.19± 0.05	0.19± 0.03
BSS/GBR比	1.03±0.22	
角膜厚さ (μm)	408 ±39	396 ±23
P_{ac} ($\times 10^{-4}$/分)	4.14± 1.64	3.87± 0.66
BSS/GBR比	1.02±0.28	
Osmolality (mOsm)	271 ± 2	270 ± 1

略号については表2参照，平均±SD，N=7.

表6　各種溶液潅流下の角膜膨潤速度

潅流液	角膜膨潤速度 (μm/hr)
BSS	40± 8
S-MA_2	40± 1
BOS	17± 2
GBR	9± 2

平均±SD，N=4.

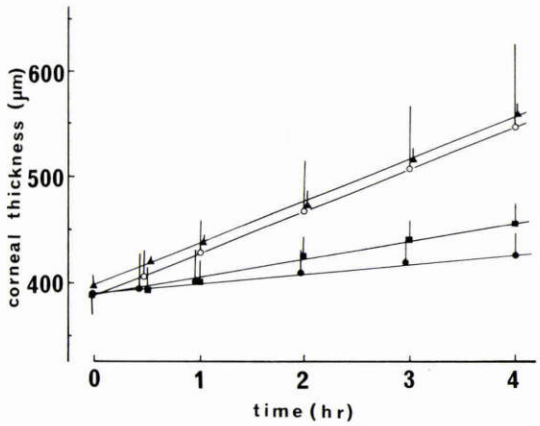

図1　各種溶液で潅流下の，角膜膨潤速度．▲：BSS，○：S-MA_2，■：BOS，●：GBR（平均±SD，N=4）

GBR-BSS間では，各々上述パラメーター間に有意差をみなかった（表5）.

しかしBSSで潅流中の角膜厚さでCFとの接触後10分での値と，同30分での値の間には後者が平均15 μm 即ち約4％，厚くなっていた（paired t-test，$p<0.01$）.

2）**角膜膨潤速度**（図1，表6参照）

BSSとS-MA_2潅流下では角膜膨潤速度間に差はみられなかったが，BOS，又はGBR潅流下での角膜膨潤速度は，それらより有意に小さく，又BOS潅流下よりGBR潅流下での角膜膨潤速度の方が，有意に小さかった．（Unpaired t-test，$p<0.005$）.

表7　各種溶液中のCa^{2+}イオン測定結果.

潅流液	測定されたCa^{2+}量 (mM)	製剤中の総Ca量 (mM)
BSS	0.68±0.01	3.3
S-MA_2	0.27±0.00	1.2
BOS	0.31±0.01	1.0
GBR	0.55±0.01	0.7

平均±SD，N=5.

3）**カルシウムイオン濃度の測定**（表7参照）

各潅流液中のカルシウムイオン濃度は，調整時に加えられた量（表1）より，何れも低かった．又，カルシウムイオン濃度は，S-MA_2 BOS，GBR，BSSの順に低かった.

IV　考　　按

GBR及びS-MA_2潅流下でのCFの角膜内皮透過性は，以前に報告された結果[1]とよく一致し，それを再確認するものであった．即ちS-MA_2で潅流された内皮細胞は，GBR潅流下に比べ約25％，CFに対して透過性が高く内皮のバリアー機能に障害が生じていると考えられた．しかしBSS，及びBOS潅流下のCFの角膜内皮透過性は，GBR潅流下と，差を認めず今回の条件下では，両潅流液とも，内皮バリアー機能に対しては，GBRと同等である事が示された.

一方，角膜膨潤率の測定では，上記と全く違った結果が得られた．即ちBSSとS-MA_2は，最も膨潤率が大きく，BOSがそれに次ぎGBRが最も小さかった．この内BSS，BOS，GBRについての結果は，従来の報告によく一致していた[3)4)]．大鳥等の報告[9)]によれば，S-MA_2中で8時間にわたり全角膜をインキュベートした場合，角膜の含水率は殆ど変化しないが，BSS内でインキュベートした場合は50％も増加するとされている．今回の実験条件下でのS-MA_2潅流下での含水率増加率はBSSとほぼ等しく，以前の報告[9)]と大きく食い違っているが，この違いの原因は，全角膜をS-MA_2中で37℃でインキュベートした大鳥等の実験[9)]と，内皮側のみをS-MA_2で37℃で潅流した今回の実験との，実験条件の違いによるとするより他には現在の所不明と言わざるを得ない．BSSと違い，S-MA_2は，角膜含水率の維持に不可欠とされる，グルコース，炭酸イオン[5)6)10)11)]をBOSやGBRとほぼ同量に含んでいるの

で，角膜の内皮機能の維持には，BSS に比べ遙かに有利なはずである．それにも拘らずBSS 潅流下と膨潤率に差がみられなかった理由は，BSS 潅流下に比べて，内皮のバリアー機能が低下しており，一方 BSS 潅流下では，S-MA_2潅流下に比べて内皮のポンプ機能が低下しているため，結局，ポンプ—バリアー機能の総和としては，差が全体としては出なかったためと考えられる[6)12)]．但し，S-MA_2潅流下での角膜の厚さの変化は，図1の SD 幅より分る如く，特に2時間後より他の潅流液に比べてかなりばらついている傾向がみられた．この原因は，明白ではないが，内皮バリアー機能が障害され受動的な水の流入が増えている場合，個々の角膜に於ける内皮のポンプ機能の予備能の差が，よりはっきり示された可能性があると考えられる．

角膜内皮の細胞間接合，即ちバリアー機能の維持には，潅流液中の Ca^{2+}が不可欠であり[6)10)12)13)]，角膜の含水率維持のためには，0.3mEq が必要最低濃度とされている[14)]．

今回の潅流液中の Ca^{2+}量は，BSS，BOS 及び S-MA_2では Ca^{2+}がクエン酸でキレートされるか[15)]，又は BOS，GBR ではリン酸カルシウムとして失なわれているため[16)]，何れもの溶液でも調剤された量より，明らかに低かった．しかし最も Ca^{2+}量が低かった S-MA_2でも0.54mEq(0.27mM)と，上記最低濃度[14)]を大きく上回っている事，BOS 中の Ca^{2+}が0.62mEq（0.31 mM）と S-MA_2中の Ca^{2+}量と殆んど同じだったにも拘らず，BOS 潅流下では CF 内皮透過性は増加してなかった事等より，単に Ca^{2+}濃度のみが，S-MA_2による CF の内皮透過性増加に影響したとは考えられない．S-MA_2の他の大きな製剤上の違いとしては，BOS，GBR に含まれているリン酸イオンを全く含まぬ事，クエン酸濃度が比較的高い事等が上げられる．しかし，BSS はリン酸イオンを全く含まず，且つクエン酸濃度は S-MA_2よりもむしろ高いにも拘らず内皮バリアー機能に変化を認めなかった事よりも推測される如く，クエン酸やリン酸イオン濃度のちがいのみでは，S-MA_2潅流下のバリアー機能変化を説明できない．現在の所，S-MA_2潅流下の内皮バリアー機能障害の原因は，不明といわざるを得ず，内皮バリアー機能と潅流液の組成に関しては，更に検討する必要があると考えられる．

従来の報告通り[1)3)~5)]，GBR は，最も角膜内皮バリアー機能及び角膜の厚さの維持に対して，優れていたが，本溶液の臨床使用は，調剤が簡単でない点に問題があり，現在の所，本邦に於ては実際上は市販の BSS，S-MA_2乃至は将来的可能性としての BOS を使用せざるを得ないのが現状である．上記三潅流液のうち，S-MA_2は内皮バリアー機能維持の点[1)]で，BSS は内皮の代謝機能の維持の点[3)]で問題があると考えられ，BOS は，その2つの点で障害が比較的少い溶液と考えられる．しかし実際手術に用いるにあたっては，さらに次の如き点をも考慮に入れる必要がある．今後白内障手術の主流となっていく可能性のある，水晶体乳化吸引術中における，前房中の気泡発性は，安全な眼内操作に対して障害となる事はよく知られている．著者等は，種々の眼内潅流液を用いて，超音波発振時の前房内気泡発生を検討したが，BOS は最も気泡発生が多く，次いで S-MA_2，BSS の順である事を見い出した[17)]．

今回得られた結果，及び，術中の気泡発生の点を総合すると，BSS，S-MA_2，BOS 何れも，未だ理想的な眼内潅流液とは言い難く，安価で，より角膜内皮に障害の少く，又臨床的に使用し易い眼内潅流液の開発の余地が残されていると考えられる．

又，理想的眼内潅流溶液の開発のためには，CF の角膜内皮透過性測定は，新しい一つの安全性に関するパラメーターを，提供するものであると考える．

文　献

1) **Araie M :** Barrier function of corneal endothelium and the intraocular irrigating solutions. Arch Ophthalmol 104 : 435—438, 1986.
2) **Merrill PL, Fleming MA, Girard LJ :** The effects of physiologic balanced salt solutions and normal saline on intraocular and extraocular tissues. Am J Ophthalmol 49 : 895—898, 1960.
3) **Edelhauser HF, van Horn DL, Hyndiuk RA,** et al : Intraocular irrigating solutions : Their effect on the corneal endothelium. Arch Ophthalmol 93 : 648—657, 1975.
4) **谷島輝雄, 松村　譲, 増田　清**：Dextran を含有する眼内灌流液の角膜内皮におよぼす影響．日眼 88 : 829—837, 1984.
5) **Dikstein S, Maurice DM :** The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. J Physiol 221 : 29—41, 1972.
6) **Mishima S :** Clinical investigation on the corneal endothelium. Am J Ophthalmol 93 : 1—29, 1982.
7) **Araie M :** Carboxyfluorescein. A dye for evaluating the corneal endothelial barrier function in vivo. Exp Eye Res 42 : 141—150, 1986.
8) **Araie M, Maurice DM :** The rate of diffusion

of fluorophores through the corneal epithelium and stroma. Exp Eye Res 44 : 73—87, 1987.

9) **大鳥利文, 中尾雄二, 直野富也**他：眼内灌流液についての研究．第3報．基礎データの総括およびS-MA_2の臨床応用．日眼　87 : 968—973, 1983.

10) **Mishima S, Kudo T :** In vitro incubaton of rabbit cornea. Invest Ophthalmol 6 : 329—339, 1967.

11) **Fischbarg J :** Active and passive properties of the rabbit corneal endothelium. Exp Eye Res 15 : 615—638, 1973.

12) **Maurice DM :** Cornea and sclera, in Davson H, (ed) : The Eye, ed, 3, Orlando, Fla, Academic Press Inc, 1984, Vol 1B, pp. 1—158.

13) **Kaye GI, Mishima S, Cole JD,** et al : Studies on the cornea. VII. Effects of perfusion with a Ca^{++}-free medium on the cornea endothelium. Invest Ophthalmol 7 : 53—66, 1968.

14) **竜山内子**：角膜内皮におよぼすCa-イオン濃度の影響．日眼　77 : 797—803, 1973.

15) **Mollison PL :** Blood Transfusion in Clinical Medicine, ed 6, Boston, Blackwell Scientific Publications Inc, 1979, pp. 18—19.

16) **Weast RC,** (ed) : Handbook of Chemistry and Physics, ed 49, Boca Raton, Fla, CRC Press Inc, 1968.

17) **江口秀一郎, 松村　譲, 新家　真**：眼内灌流液と超音波水晶体乳化術中の気泡発生について．臨眼 41 : 535—540, 1987.