

レドックスフルオロメーターによる

保存角膜の糖代謝の検討 (図6, 表1)

坪田 一男¹⁾・千葉 桂三²⁾・Ronald A. Laing³⁾ Kenneth R. Kenyon⁴⁾
¹⁾ 慶応義塾大学, 国立栃木病院
²⁾ 独協医科大学
³⁾ Boston University School of Medicine
⁴⁾ Harvard Medical School

Noninvasive Metabolic Analysis of Cultured Corneas

Kazuo Tsubota, Keizo Chiba*, Ronald A. Laing**,
and Kenneth R. Kenyon***

Keio University School of Medicine, National Tochigi Hospital

**Dokkyo University School of Medicine*

***Boston University School of Medicine*

****Harvard Medical School*

要 約

糖代謝における重要な補酵素である還元型ピリジンヌクレオシド (特に NADH, PN) と酸化型フラボプロテイン (Fp) を保存角膜において測定し, これらの補酵素と保存時間の関係につき検討を加えた。白色ウサギ強角膜片を MK-medium 中4°Cにて保存し, レドックスフルオロメーターにて角膜内皮中の PN および Fp 量を経時的に測定した。測定は保存直後, 1, 2, 3, 7, 14, 21日目に行ない, PN と Fp の比を用いてパラメーターとした。また透過型および走査型電子顕微鏡にて7, 14, 21日目の角膜を組織学的に検討した。保存直後の PN/Fp 比は 0.77 ± 0.14 であり7日後には 0.70 ± 0.31 となったが, この間に統計学的に有意な変化は示さなかった。14日後にはこの比が 0.33 ± 0.11 となり, 21日後には 0.27 ± 0.06 と有意な減少 ($p < 0.0001$) を示した。組織学的には7日目の角膜は正常範囲内にあったが, 14日, 21日保存角膜は細胞内浮腫など様々な異常を示していた。以上の結果より PN/Fp 比は保存角膜の評価の新しいパラメーターとして応用できる可能性が示唆された。(日眼 92: 1321—1326, 1988)

キーワード: レドックスフルオロメーター, 角膜移植, 糖代謝, 角膜内皮, ピリジンヌクレオシド, フラボプロテイン

Abstract

Non-invasive assessment of the metabolic status of cultured corneas prior to their consideration for use as donor tissue would provide a major improvement in the evaluation of eye bank tissue. We have developed methods for performing such an assessment using the method of corneal redox fluorometry. Using this method, the autofluorescence of reduced pyridine nucleotides (PN) and oxidized flavoproteins (Fp) were measured as a function of storage time in rabbit corneal endothelium stored in McCarey-Kaufman medium. The PN/Fp ratio is related to the metabolic status of the tissue measured. It was found that the PN/Fp ratio changed dramatically during storage showing that the metabolic state was significantly changing during the storage period. The PN/Fp ratio stayed within the original level up to 1 week and then decreased significantly at 2 and 3 weeks observation period.

別刷請求先: 320 栃木県宇都宮市中戸祭 1—10—37 国立栃木病院眼科 坪田 一男 (昭和63年 3 月28日受付)

Reprint requests to: Kazuo Tsubota, M.D. National Tochigi Hospital

1-10-37, Nakatomatsuri, Utsunomiya, Tochigi, Japan 320

(Accepted for publication March 28, 1988)

The transmission electron microscopic pictures of these corneas supported the redox fluorometric findings showing abnormal endothelium only at 2 and 3 weeks observation period. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1321—1326, 1988)

Key words: Rodox fluorometry, Corneal preservation, Corneal endothelium, Pyridine nucleotide, Flavoprotein, Glycolytic metabolism

I 緒 言

眼球銀行保存角膜の適切な評価は角膜移植の成功にかかせない重要な要因である。現在移植角膜の評価はドナーの年齢、死亡より眼球摘出までの時間、保存期間、スリットランプで観察した角膜の状態により行なっているが未だ客観的な方法は開発されていない。角膜内皮細胞は障害によりその形態を変化することが知られているのでスペキュラーマイクروسコープによる角膜内皮の観察は最近になって使用され始めた良い方法のひとつである^{1)~3)}。³¹P-NMRによるりん代謝測定の方法も将来性が期待されている方法のひとつである^{4)~5)}がNMRの臨床応用には多額の費用を要し、その方法も複雑なため実際の応用にはまだまだ時間がかかると思われる。レドックスフルオロメーター

は保存角膜の評価を客観的に行なうことのできる新しい方法である。この方法は、還元型ピリジンスクレオシド(PN)と酸化型フラボプロテイン(Fp)を測定することにより角膜の代謝状態を評価するものである^{6)~7)}。今回著者らは、保存角膜のPNおよびFpを経時的に測定し、レドックスフルオロメーターの眼球銀行保存角膜評価への応用の可能性につき検討を加えた。

II 実験方法

1. レドックスフルオロメーター

レドックスフルオロメーターは還元型ピリジンスクレオシドと酸化型フラボプロテインをその特徴ある蛍光を用いて測定するがその原理はピリジンスクレオシドが360nmの励起光にて460nmの蛍光を発生し、フラボ

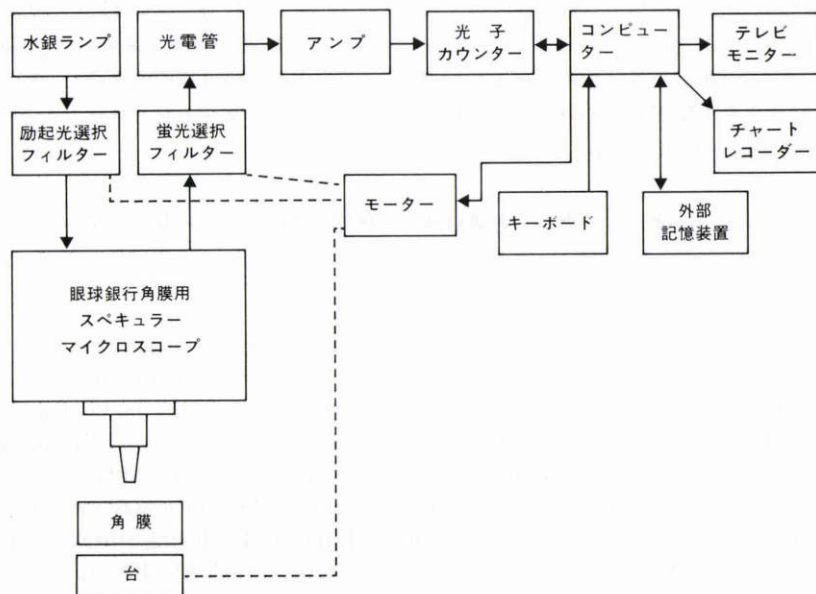


図1 レドックスフルオロメーターのダイアグラム。ハロゲンランプから出た光は特殊フィルターを通してスペキュラーマイクローフコープへ導かれる。角膜からの蛍光のみをフィルターにて選別し光電管に導く。角膜の位置ぎめ、フィルターの選択はマイクロコンピューターが自動的に行なう。データはフロッピーディスクに保管され、後に統計学的解析を行なうことができる。

プロテインが440nmの励起光にて550nmの蛍光を発生することにある⁸⁾⁹⁾。使用したレドックスフルオロメーターはスペキュラーマイクروسコープを利用してその測定部位を決めることができるようになってい⁶⁾⁷⁾。このシステムはマイクロコンピューターにて制御されておりフィルターの自動交換、データの収録、保管、解膜内皮から上皮への自動スキャンを行なうことができる(図1)。

測定の際には焦点を測定部位に合せ、0.1秒間の蛍光を測定する。角膜内皮より上皮までを10μm毎にスキャンすることにより、内皮より上皮までの蛍光スキャンが測定できる。このスキャンにより角膜の位置ぎめを行ない、その後に角膜内皮の中心に焦点を合せ、0.1秒毎に30回蛍光を測定した。この30回の蛍光測定の平均値と標準偏差を計算して1データとして取り扱った。

2. 保存角膜の PN/Fp 比測定

ウサギ(ニュージーランド白色種、体重3~4kg)10羽をケタミンおよびxylazineにて麻酔し、さらにキシロカインにて球後麻酔を行なった。右眼球摘出後、強角膜切片を作成しMacarely-Kaufman Medium(MK-medium)中に保存し実験に用いた。10眼の角膜のうち7眼をレドックスフルオロメーターの測定に用い、3眼を走査および透過型電子顕微鏡による評価に用いた。レドックスフルオロメーターの測定は角膜切片を作成しMK-medium中に保存した直後にまず行い、その後は4℃に保存した。保存第1日目以降は、角膜を冷蔵庫から取り出した直後より2時間の間連続して行った。この間MK-mediumの交換は行なわなかった。この連続測定のPN/Fp比の7眼の平均と標準偏差を各保存日における角膜内皮のパラメーターとして

使用した。
3. 組織学的検索
MK-mediumに1週間、2週間、3週間保存された角膜を2.5%グルタルと2%の paraformaldehyde 混合の sodium cacodylate 緩衝液に固定した。固定後、角膜切片を半割し一片を走査型電子顕微鏡に、もう一片を透過型電子顕微鏡に用いた。走査型電子顕微鏡用の切片は0.1Mの sodium cacodylate にて洗いエタノールにて脱水後臨界点乾燥を行ない、AMR1000走査型電子顕微鏡にて角膜内皮を観察撮影した。透過型電子顕微鏡用の切片は2%オスミウムにて後固定しエタノールにて脱水後エボン包埋した。切片は uranyl acetate-lead citrate にて染色し走査型電子顕微鏡(Philips 410)にて観察した。

III 結 果

新鮮角膜の内皮より上皮までのPNおよびFpスキャンを図2に示す。解像力は十分で、角膜内皮、実質、上皮の3層を識別することができる。PNではまず内皮のピークに比べて上皮のピークが大きく測定される。一方Fpでは内皮のピークに比べて上皮のピー

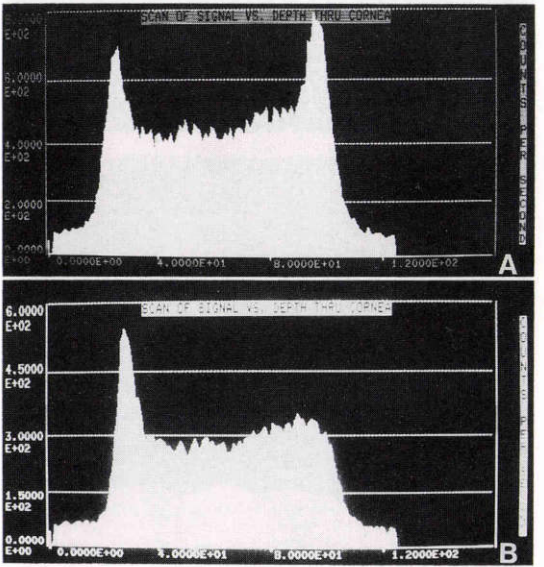


図2 A:角膜内皮より上皮までのPNスキャン。縦軸に蛍光量を、横軸に内皮側より上皮側にむかっての距離をとってある。まず角膜内皮にピークがあり、その後に実質の平坦部が続いている。最後のピークは上皮のもので内皮より大きい。B:同Fpスキャン。内皮のピークに続いて実質の平坦部があるが、PNスキャンと比べると上皮のピークが少ない。

表1 MK-medium 保存ウサギ角膜内皮のPN/Fp比の時間的变化

角膜保存日数	PN/Fp 比
保存直後	0.77±0.14
1	0.85±0.20
2	0.91±0.49
3	0.73±0.11
7	0.70±0.31
14	0.33±0.11*
21	0.27±0.06*

*はPN/Fp比が保存直後の値より統計学的有意に低いことを示す(T test, p<0.0001).

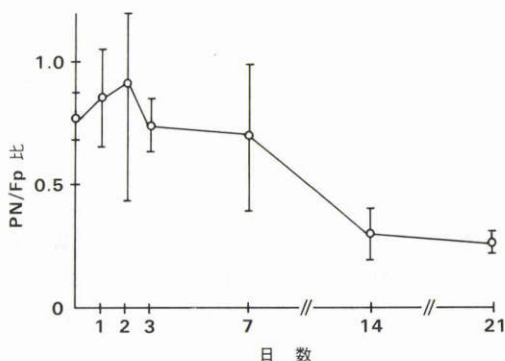


図3 MK-medium 保存ウサギ角膜内皮の PN/Fp 比の変化。保存1週間目までは保存直後の値と変りはないが、2週間、3週間となるとこの比は低下するのがわかる。

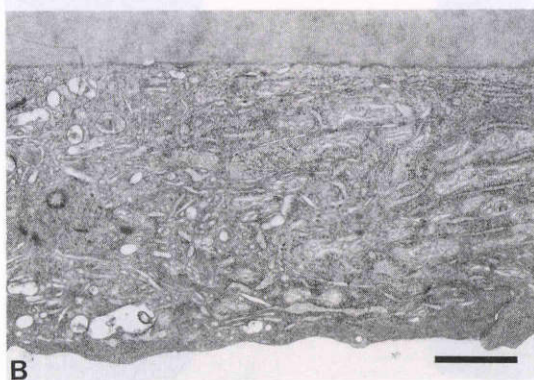


図4 1週間 MK-medium に保存したウサギ角膜内皮の走査型 (A) および透過型電子顕微鏡写真 (B)。両方とも共にほぼ正常の像を示している。(A: $\times 1000$, バーは $20\mu\text{m}$, B: $\times 18,000$, バーは $1\mu\text{m}$)

クは小さい。PN 蛍光はミトコンドリアおよび細胞質から由来するが、Fp 蛍光はミトコンドリアのみに由来するため、ミトコンドリアの少ない上皮ではピークが

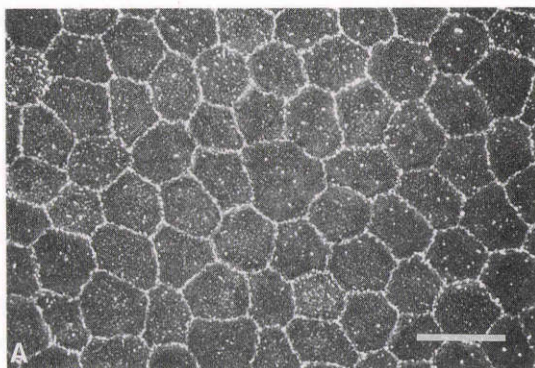


図5 2週間 MK-medium に保存したウサギ角膜内皮の走査型 (A) および透過型電子顕微鏡写真 (B)。走査型電子顕微鏡上は正常範囲内だが、透過型電子顕微鏡にて細胞内の浮腫、ミトコンドリアの膨化がみられる。(A: $\times 1000$, バーは $20\mu\text{m}$, B: $\times 15,000$, バーは $1\mu\text{m}$)

小さくでることになる。3週間にわたる MK-medium 保存の角膜内皮の PN/Fp 比を表1、図3に示す。PN/Fp 比は第1日、第2日目に増加した後少しずつ減少していゆくが1週間目までは初日の値との間に統計的な有意差をみだせなかった (paired T test)。2週目、3週目では PN/Fp は有意に減少し、その際標準差も減少していた。

図4、5、6は1週間、2週間、3週間保存された角膜内皮の走査型および透過型電子顕微鏡写真である。走査型電子顕微鏡では3週間保存の角膜の表面構造は保たれていた。一方、透過型電子顕微鏡では、1週間目までの角膜は細胞内構造を比較的良く保っていたが、2、3週となると細胞内浮腫が著明となり角膜の厚みも増加していた。

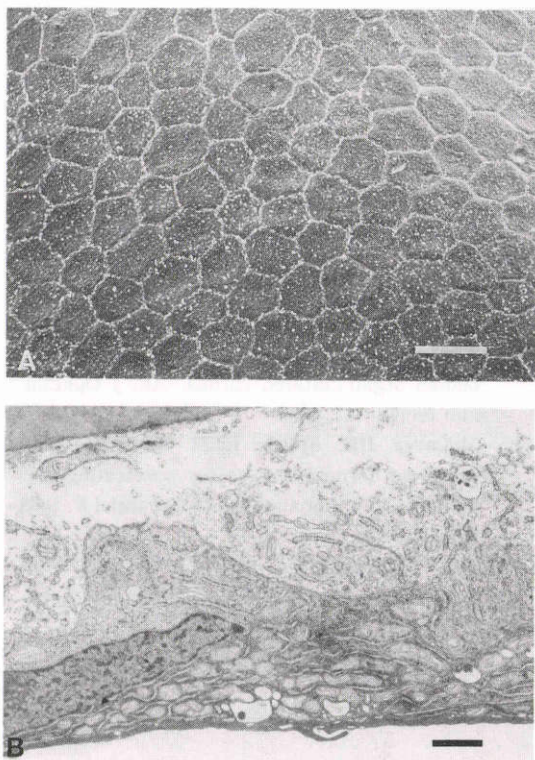


図6 3週間 MK-medium に保存したウサギ角膜内皮の走査型(A)および透過型電子顕微鏡写真(B)。走査型電子顕微鏡上は未だ正常の6角形構造をとっているが、透過型電子顕微鏡ではさらに細胞内の浮腫の増加およびミトコンドリアの膨化がみられる。(A: $\times 800$, バーは $20\mu\text{m}$, B $\times 11,000$, バーは $1\mu\text{m}$)

IV 考 案

MK-medium 中に保存された角膜内皮の PN/Fp 比は最初の1週間は保存直後と同じレベルに保たれているが、2週、3週間目となると明らかな低下を示していた。さらにこの平均値の標準偏差も少なくなってきた。この現象は代謝における基質や adenosine diphosphate (ADP) の減少のためであろう¹⁰⁾。細胞質の解糖系やミトコンドリア内の酸化的りん酸化の代謝速度が基質の欠乏のために遅くなると nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) の産生は減少し PN/Fp 比は減少することになると推測される。今回の実験では3週間にわたり medium の交換を行っていないので medium 中の glucose の減少や lactate の増加も内皮の代謝に影響を与えたと考えられる¹¹⁾。走査型電子顕微鏡では1～3週間保存の間に著明な差を認め

ない。一方透過型電子顕微鏡では1週間までは細胞内の浮腫は軽度であるが2週以降となると細胞内変性が著明になっていた。臨床的にも MK-medium 中の保存は3～4日が最適で1週間保存が限度とされている¹²⁾。PN/Fp 比が1週間保存までは保存直後と有意差を示さず、2週間目、3週間目では有意の低下を示していることは、従来からの研究および臨床経験と一致するところであり大変興味深い。PN/Fp 比には正常状態の最適なレベルが存在し、もしこのレベルよりはずれると細胞内代謝バランスの崩壊を表している可能性が十分あると考える。我々はまた PN/Fp 比の標準偏差は主にこの比のオシレーション(振動)に起因していると考えており、代謝が停止している状態ではこのオシレーションが存在しないので、PN/Fp 比の標準偏差の減少も代謝状態の低下を表していると考えている¹³⁾。保存角膜の活性度はその保存時間とともに減少すると考えられるがこの代謝の低下が PN/Fp 比の減少として測定されると考えるとこの比が細胞の活性度の指標となりうる可能性が十分ある。

興味ある現象は、第1日目にはこの比が一時増加することである。この現象は角膜の MK-medium への適応により起るのか角膜切片作成時の手術侵襲によるものかははっきりせず、将来の研究に待ちたい。

実際の眼球銀行角膜では今回の実験と異なり、ひとつひとつの角膜で様々の要因により代謝レベルが異なっているものと思われる。しかしながらヒト角膜もウサギ角膜と同様嫌気性解糖系とミトコンドリアの TCA サイクルの両方の代謝を持っており、今回観察された傾向が存在することは十分考えられることである。この測定はスペキュラーマイクロスコープと同様侵襲なく短い時間で測定することができるので、眼球銀行眼において実際にヒト角膜を用いて測定を行なうことができる。将来 PN/Fp 比のヒト角膜における正常範囲を決定してゆけば保存角膜に代謝レベルからの評価を行なうことができると考え、現在実験を行なっている。

文 献

- 1) Neubauer L, Laing RA, Leibowitz HM, et al : Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short-term storage. Arch Ophthalmol 102 : 439—444, 1984.
- 2) 沢 充, 水流忠彦 : 移植用摘出眼球の角膜内皮細胞観察用 Chamber とその臨床応用. 臨床眼科 39 : 1015—1018, 1985.

- 3) **Matsuda M, Yee RW, Glasser DB, et al:** Specular microscopic evaluation of donor corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 104: 259—262, 1986.
- 4) **Greiner JV, Lass JH, Glonek T:** Metabolic status of fresh vs eye-bank-processed corneas. A phosphorus nuclear magnetic resonance study. *Arch Ophthalmol* 102: 1676—1677, 1984.
- 5) **Greiner JV, Lass JH, Glonek T:** Ex vivo metabolic analysis of eye bank corneas using phosphorus nuclear magnetic resonance. *Arch Ophthalmol* 102: 1171—1173, 1984.
- 6) **Laing RA, Fischbarg J, Chance B:** Noninvasive measurements of pyridine nucleotide fluorescence from the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 96—102, 1980.
- 7) **Tsubota K, Laing RA, Kenyon KR:** Noninvasive measurements of pyridine nucleotide and flavoprotein in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 785—789, 1987.
- 8) **Chance B, Baltscheffsky H:** Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 223: 736—741, 1958.
- 9) **Chance B, Shoener B, Oshino R, et al:** Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 254: 4764—4771, 1979.
- 10) **Chance B, Baltscheffsky H:** Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 223: 736—741, 1958.
- 11) **Lindstrom RL, Doughman DJ, Van Horn D:** A metabolic and electron microscopic study of human organ-cultured cornea. *Am J Ophthalmol* 82: 72—82, 1976.
- 12) **McCarey BE, Meyer RFM, Kaufman HE:** Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in humans. *Ann Ophthalmol* 8: 1488—1495, 1976.
- 13) **坪田一男, Laing RA:** 角膜上皮の糖代謝におけるオキシレーションの存在と代謝阻害剤の及ぼす影響. *日眼* 92: 959—962, 1988.