

緑膿菌性眼内炎の実験的研究

—硝子体内接種による病像, 眼内生菌数, ERG—(図5)

秦野 寛・佐々木隆敏・田中 直彦 (横浜市立大学医学部眼科)

Pseudomonas Endophthalmitis in Rabbits

—Intravitreal Inoculation of Two Pseudomonal Strains—

Hiroshi Hatano, Takatoshi Sasaki and Naohiko Tanaka

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

要 約

ウサギ眼の硝子体に緑膿菌を接種して眼内炎を発症させ, 病像の経過, 眼内生菌数の動態, ERG 変化について調べた. 前房内での緑膿菌強毒株と弱毒株の2株を用い, 硝子体における病原性を比較した. その結果, 硝子体でも前房内強毒株が病像の経過, 眼内生菌数, ERG のすべてで, より強い病原性を示した. 両株ともに, 菌5個(理論値)の硝子体内接種で全例が眼内炎を発症して全眼球炎に至り, 網膜機能を2日以内に破壊した. 病像の経過は硝子体内生菌数の動態と平行し, 両者の極期はともに感染後24時間であった. ERG ではb波の減衰が先行し, 接種2日後までにはa波, b波ともに消失した. (日眼 92:1758—1764, 1988)

キーワード: 緑膿菌, 眼内炎, 硝子体内接種, 網膜電図

Abstract

Pseudomonas endophthalmitis was investigated using adult albino rabbits. The course of the disease and electroretinography findings were followed for a week after intravitreal inoculation. We also counted the viable cells number of *Pseudomonas aeruginosa* in the eye after infection. The ocular findings became most marked at 24 hours after infection, in concomitance with the highest number of viable cells in the vitreous cavity. Five cells of virulent and avirulent strains of *Pseudomonas* invariably caused panophthalmitis and destroyed the total retinal function. The amplitude of the b-wave in the ERG decreased first, and then both of the a- and b-wave became extinguished no later than at two days after infection. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 92: 1758—1764, 1988)

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Endophthalmitis, Intravitreal inoculation, ERG (electroretinography)

I 緒 言

細菌性眼内炎は感染経路にかかわらず, 一旦発症すると, 経過は迅速で, 視力予後が極めて不良な眼感染症である. また起炎菌^{1)~3)}についてはグラム陰性杆菌の検出頻度が増加してきており, 中でも緑膿菌による

ものは特に難治で予後が悪い.

眼内炎の感染経路は前房水と硝子体に大別される. これらの基礎的実験モデルとしては, ウサギの前房と硝子体内に細菌を接種した Maylath ら⁴⁾のものや, ウサギの前房に細菌を接種した Tucker ら⁵⁾のものなど, 眼内炎の診断に関するものがみられる. また小川

別刷請求先: 232 横浜市南区浦舟町3-46 横浜市立大学医学部眼科学教室 秦野 寛
(昭和63年5月21日受付, 昭和63年8月31日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Hatano, M.D. Dept. of Ophthalmol., Yokohama City Univ. School of Med.
3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

(Received May 21, 1988 and accepted in revised form August 31, 1988)

ら⁶⁾はモルモットの硝子体に緑膿菌を接種して硝子体内生菌数をみている。

著者ら⁷⁾は、すでに前房内感染による眼内炎の自然経過を知りかつ緑膿菌の眼内組織に対する菌株間の病原性を比較する目的で、緑膿菌計6菌株をウサギ前房内に接種する実験を行ない、前房において緑膿菌には菌株間に毒性の差があることを報告した。

今回は、上記実験での前房内強毒株と弱毒株の各1株を用いて、硝子体内感染による眼内炎の自然経過を知りかつ両株の硝子体における病原性を定量的に比較する目的で実験を行なった。ここでは病像の経過、眼内生菌数の動態について調べると同時に、網膜機能のおよその推移をみる目的で、網膜電図(ERG)を記録した。

これらの知見は、すでに前房内接種実験で得た情報と合わせて、細菌性眼内炎の基礎的病態の解明、かつその診断と治療に資すると考えられる。

II 実験方法

1. 材料

- 1) 動物：成熟白色ウサギ，体重2.0～2.4kg，42匹。
- 2) 菌株：緑膿菌75株(Protease, Elastase 産生株)

と緑膿菌伊藤株(Protease, Elastase 非産生株)。酵素産生能はカゼインおよびエラスチン含有平板培地により判定した。

2. 方法

1) 接種用菌液の調整：Trypto-soy-broth(TSB, 栄研)培地で振盪培養して得た菌液を、同培地で菌 10^2 /mlに希釈調整した。

2) 接種法：ウサギにpentobarbital sodium(25mg/kg)の静脈注入麻酔とベノキシール®点眼麻酔を施した後、角膜輪部上方5mmの所で、30gauge針付1ml注射器で強膜を穿刺し、硝子体中央部に 10^2 /ml菌液0.05ml(理論値で菌5個)を注入した。なお、接種直前、菌液逆流を防止するため、30gauge針付1ml注射器で前房水を0.2ml抜去して眼圧を下げた。

3) 実験1. 眼内炎とERGの経過：両株とも各々ウサギ3匹6眼の硝子体に同時に接種した。炎症症状は経時的にスリットランプで観察し、前房内接種実験⁷⁾と同じ程度判定規準で0から6までのスコアにより判定した。病像観察と平行してウサギ全例のERGを接種前、接種後6, 12, 24, 48時間計5回記録した。記録にはERG記録装置(半田屋)ER502を用いた。ウサギは暗順応せず未散瞳で、一定照明下(50～100lx)

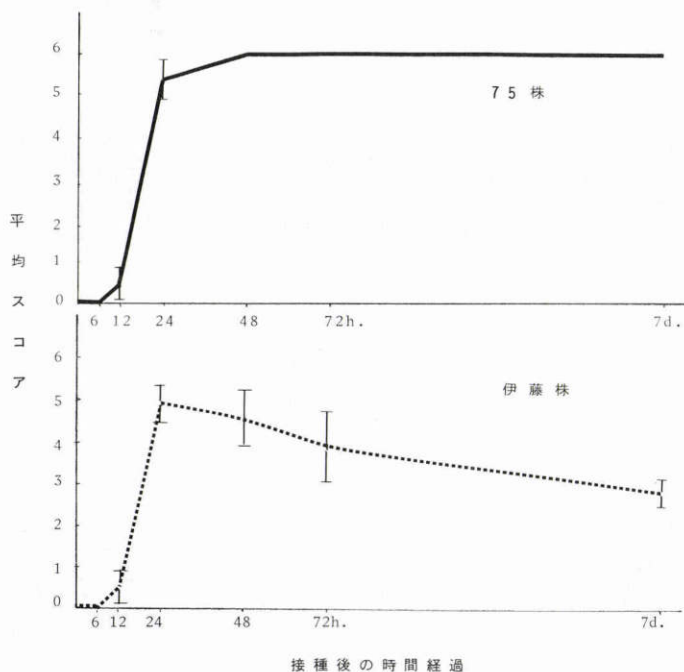


図1 緑膿菌性眼内炎の経過(上下グラフは各々75株と伊藤株の 10^2 /ml, 0.05mlを硝子体内注入した後の眼内炎の病像の経過を平均スコアで示す。)

にて、点眼麻酔の上、閃電極のコンタクト電極を角膜に、不閃電極を頭皮に、接地電極を耳介におき、光刺激50 joulesを眼前約5cmで行ない、時定数30msecで記録した。

なお、接種7日の最終観察の後、全例の眼球を摘出し、4%ホルマリン固定後、眼軸面で2分割し眼内を肉眼的に観察した。

4) 実験2. 眼内生菌数の測定⁷⁾; 両株接種群とも、各々ウサギ18匹36眼ずつに対して、実験1と同様に菌を接種した後、6、12、24、48、72時間と7日後に、

各時期3匹6眼を摘出し、個々眼の硝子体内および前房内の生菌数を平板培養法にて算定した。

III 結 果

実験1. 眼内炎とERGの経過

1. 眼内炎(スコア)の経過(図1)

1) 75株接種群(図1, 実線); 接種後6時間の病像スコア(以下すべて平均値)は0であった。12時間後になると、軽度の結膜充血、浮腫、眼脂と前房混濁をみとめたが、徹照は良好で、スコアは0.5であった。12

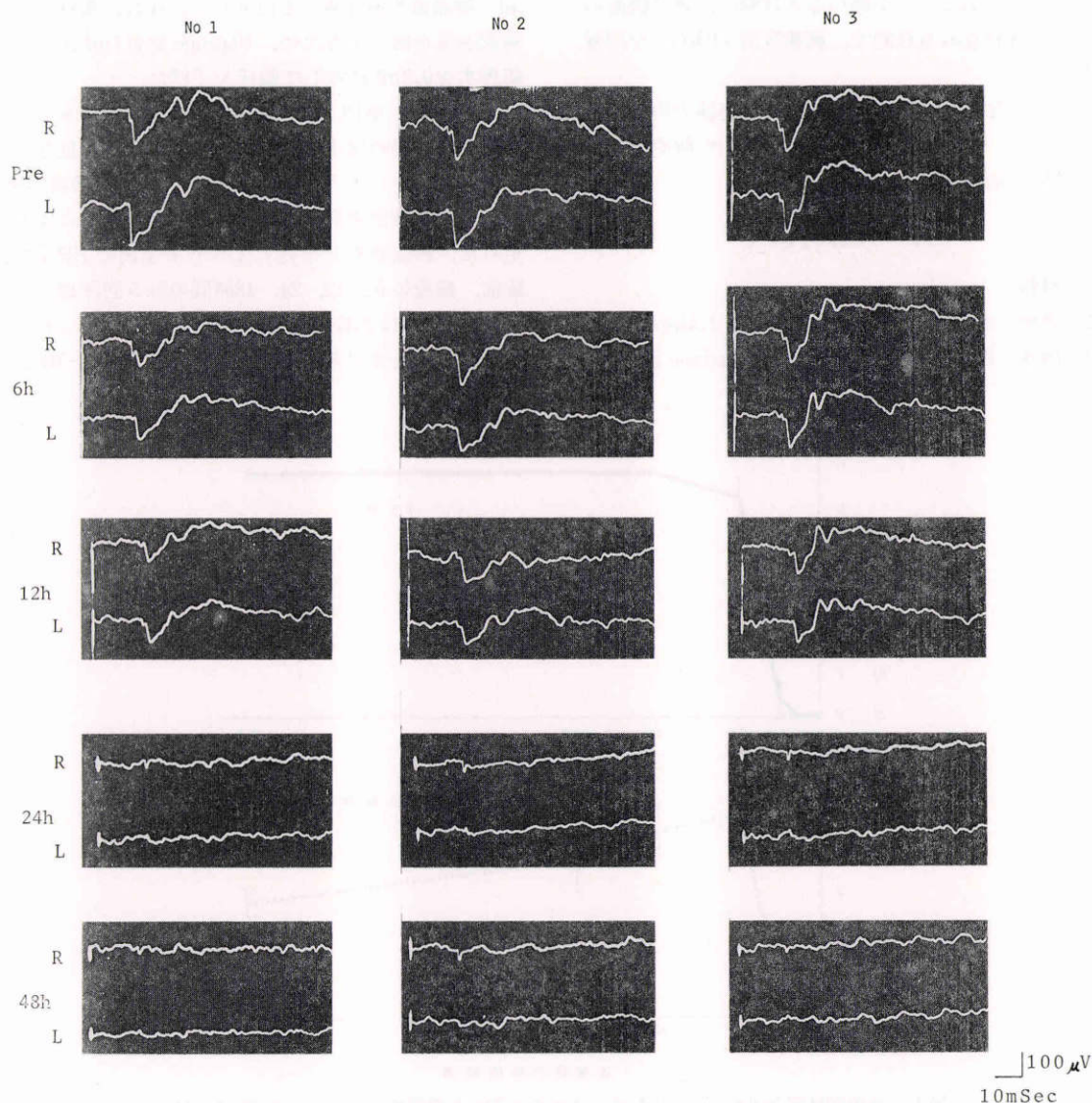


図2 緑膿菌性眼内炎のERG(強毒株; 75株接種の3匹6眼)

時間から24時間にかけて結膜所見がより顕著となり、前房混濁が急に増加し、浸出物もみとめられるようになり、前房混濁は増大した。徹照も不良となり、24時間後スコアは5.4となった。その後、48時間に至るまで病像はさらに進展し、スコアは6.0（満点）となった。その後、病像は漸次軽快したが、最終観察日の7日まで、スコアは6.0のまま接続した。

2) 伊藤株接種群（図1，破線）：接種後6時間ではスコアは0であった。12時間後になると、結膜、前房に軽度の変化が出現し、スコア0.5となった。12時間か

ら24時間にかけて病像は急激に進展し、24時間後、結膜、前房所見ともに明瞭となりスコアは4.9となった。以上のように、24時間後までは、75株と類似した経過を示した。その後48時間にかけては、さらに症状の進展がみられた75株とは異なり、症状は軽減し始めた。48時間後のスコアは4.5となり、72時間ではさらに軽減して3.9となり、最終観察日の7日で2.8とスコア上でも病像は明らかに漸減した。

2. ERG の経過（図2，3）

1) 75株接種群（図2）：ウサギ3匹（No. 1, 2, 3）

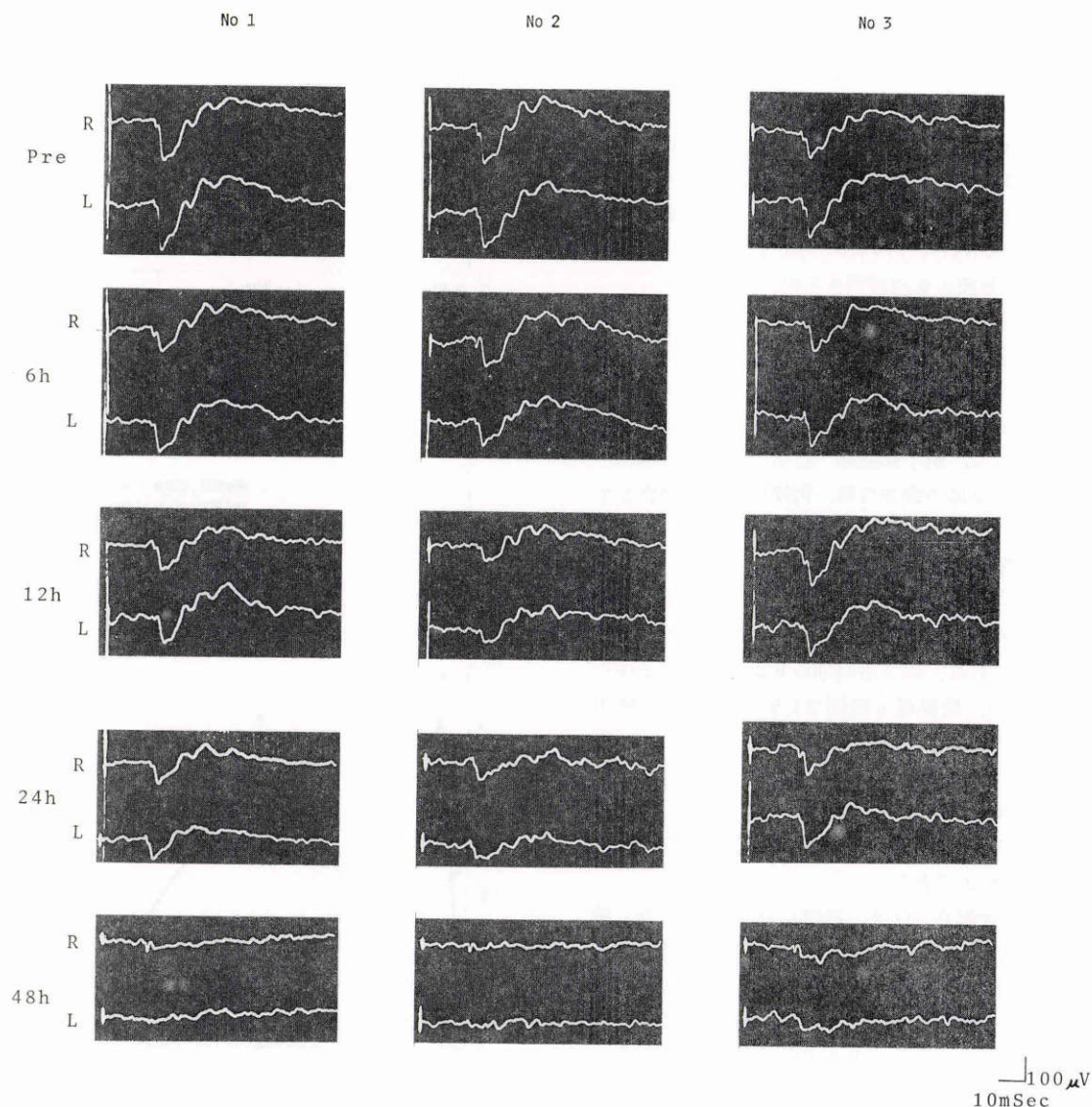


図3 緑膿菌性眼内炎のERG（弱毒株；伊藤株接種の3匹6眼）

6眼の経時的变化を、以下接種前波形と比較してみる。接種6時間後ではNo. 1両眼のa, b波, No. 2右眼b波, 左眼a, b波に軽度減衰をみとめた。No. 3には変化なかった。12時間後になると波の減衰はさらに顕著となり、No. 1両眼a, b波はともに約半分に減衰した。No. 2左眼a波は約半減し、両眼b波はほぼ消失した。No. 3両眼a, b波はともに約半分に減衰した。接種後24時間では、3匹6眼全例で、a, b波ともに消失した。48時間も同様であった。

2) 伊藤株接種群(図3)；接種6時間後では、No. 1両眼a波の振幅がほぼ半減し、左眼b波がやや減衰した。No. 2, No. 3の4眼でははっきりした変化はなかった。12時間ではNo. 1両眼は6時間の所見と変りなく、No. 2両眼a, b波ともに半分以下に減衰した。No. 3は変化なかった。24時間では、No. 1右眼a波は6時間と同様であるが、b波の半減をみとめた。左眼a波は半減し、b波はほぼ消失した。No. 2両眼のa波はともに大幅に減衰し、b波はほぼ消失した。No. 3両眼a波は変化はないが、b波はほぼ消失した。48時間では3匹6眼全例でa, b波ともほぼ消失した。

3. 肉眼的病理所見

接種7日後での眼球断面の肉眼的観察では、両株接種群の各3匹6眼全例で、広範囲の硝子体膿瘍をみとめた。両株の比較でみると、75株接種眼の方が伊藤株接種眼に比べて、硝子体膿瘍、前房内浸出物ともに、より多量で、全体の眼球容積、角膜径もより増大していた。

実験2. 眼内生菌数の動態(図4, 5)

1. 硝子体内生菌数(図4)

1) 75株接種群(図4, 実線)；全時期全例の眼球から菌は検出された。以下各時期の6眼平均の硝子体内生菌数をみる。接種後6時間で 1.6×10^4 個/眼を検出し、さらに12時間では 4.4×10^6 個/眼へ増加し、ついに24時間で最大値の 1.5×10^7 個/眼に達した。48時間になると 7.4×10^4 個/眼の減少した。72時間はさらに減少して 4.1×10^4 個/眼となり、最終日の7日後で 6.2×10^4 個/眼の菌が検出された。

2) 伊藤株接種群(図4, 破線)；75株と異なり、菌は必ずしも全ての時期では検出されず、6時間後の6眼中1眼、7日後の6眼中3眼からは菌は検出されなかった。以下各時期を追って示す。6時間では 7.0×10^2 個/眼、12時間では 7.5×10^4 個/眼と時間を追って増加し、75株同様24時間で最大値 6.0×10^6 個/眼に達した。48時間では 1.4×10^4 個/眼へ減少し、72時間では $6.3 \times$

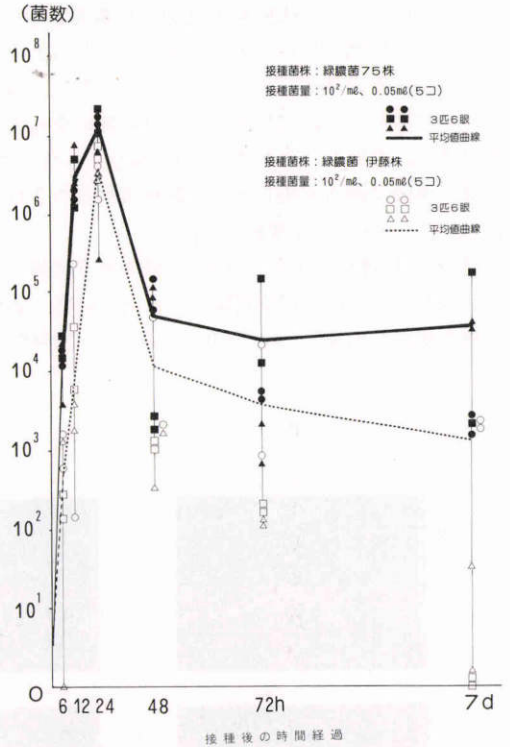


図4 硝子体内生菌数の動態(硝子体内接種)

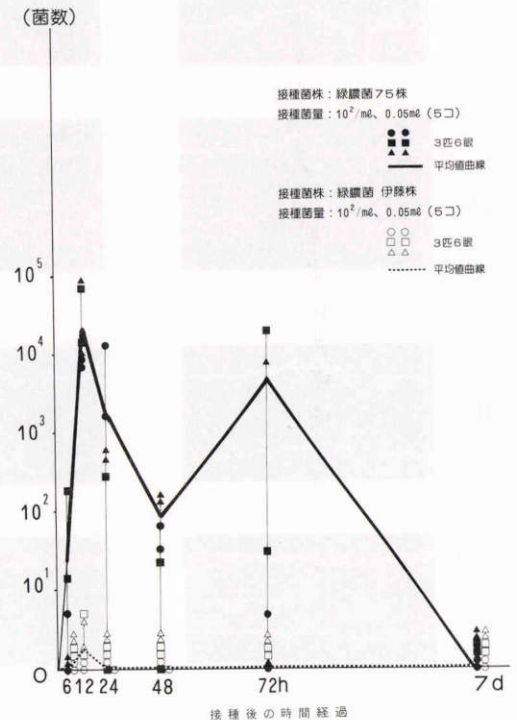


図5 前房内生菌数の動態(硝子体内接種)

10³個/眼、最終日の7日ではさらに1.0×10³個/眼へと減少した。

2. 前房内生菌数(図5)

1) 75株接種群(図5, 実線): 硝子体内生菌数を測定したと同一の眼球からの前房内生菌数を示す。前房から菌が検出された眼数を時期別の各6眼でみると、6時間で3眼、12時間6眼、24時間48時間で各5眼、72時間4眼、7日0眼であった。以下、時期別の平均生菌数をみる。6時間後では4.8×10³個/眼を検出し、12時間になると増加して最高値3.8×10⁴個/眼を検出した。しかし24時間になると2.6×10³個/眼へ減少し、48時間後9.3×10³個/眼、72時間6.5×10³個/眼で、7日後には0となった。

2) 伊藤株接種群(図5, 破線): 12時間後で、2眼の前房から菌が、平均して2.5個/眼検出された以外は、全時期で検出されず0であった。

IV 考 按

細菌性眼内炎は臨床上前房の発症動機によって外因性と内因性に大別される。外因性は外傷、手術、潰瘍などによる強角膜穿孔に続発する感染、および緑内障濾過手術後の晩発感染など先ず菌が房水に感染するもの(前房水感染型)と、硝子体内異物などの硝子体直達性の外傷、手術による穿孔に続発して菌が硝子体に直接感染するもの(硝子体感染型)とに大別される。内因性は菌が血行性に眼内に転移するもので大半が硝子体感染型に属するものと思われる。今回の実験モデルは硝子体感染型であり、本稿では硝子体感染型の眼内炎の基礎的検討をする。

先ず眼内炎の基本的経過をふりかえてみたい。強毒株(75株)では平均スコアが接種後24時間から48時間にかけて最高値に達し(図1, 実線)、弱毒株(伊藤株)でも24時間で最高値に達した(図1, 破線)。また硝子体内生菌数の動態をみると両株とも接種24時間でその菌量が最高値に達した(図4)。従って病像の頂点は硝子体内菌増殖の頂点と時期的にはほぼ一致している。また接種24時間以降をみても、やはり臨床像と硝子体内生菌数とは両株ともほぼ正の相関を示した。他方、前房内生菌数(図5)と病像(図1)とは互いにその消長が一致しなかった。以上から硝子体感染型細菌性眼内炎の病像の消長は硝子体内菌増殖を直接反映したものであり、両者は平行していると考えられる。以上、硝子体感染型の緑膿菌性眼内炎の病像の極期は、感染後1日であった。

次に眼内生菌数の動態そのものについてみたい。強毒株についてみると硝子体内では接種後6時間ですでに接種菌量を3.2×10³倍した程の急激な菌増殖をみとめ、さらに12時間後では8.8×10⁵倍にまで増殖し、この間対数グラフ上で直線の増殖を示した(図4, 実線)。これは細菌培地における菌増殖の対数期(logarithmic phase)と同様である。24時間で菌量は最高値に達するが、この時期は直線性がくずれて定常期(stationary phase)に移行するようにみえる。その後2日から7日までの4日間でも相当量の菌が持続的に存在した。以上みる限り、硝子体という環境があたかも細菌用培地の役割りを果たしているように思われる点は興味深い。また硝子体内菌増殖を菌株間で比べると、常時、強毒株が弱毒株を上まわる(図4)ことも判った。

次に菌接種部位である硝子体から、となりの前房への感染拡大についてみるため、同一眼の前房内生菌数についても同時に算定した。先ず75株では、前房内での菌量は常に硝子体よりも少なく、その動態も硝子体のそれとは異なっていた。菌量は硝子体での極期より早い12時間で最高値に達した後すみやかに減少して、7日では菌は全く検出されない(図5, 実線)。伊藤株では前房からは菌は殆ど検出されない(図5, 破線)。従って硝子体から前房への感染拡大力および前房での増殖力も明らかに強毒株が強いことが判った。

次に眼内炎のERGについてみる。今回ERGは硝子体感染時の網膜機能のおよその経時変化をみるとともに、菌株病原性の比較の一法として用いた。先ず菌株別にみると、75株では24時間後全例でa, b波が消失する(図2)のに対して、伊藤株では48時間後に同様の状態となり(図3)網膜機能消失までに24時間の差があった。このようにERG所見からも、硝子体内接種においても75株が伊藤株よりも毒性の強いことが判る。結論として、重視すべきは、緑膿菌は弱毒株の菌5個(理論値)の微量でも一旦硝子体に入ると、48時間以内に網膜機能をほぼ消失させる恐るべき毒性を持つという事実であろう。

ここで緑膿菌そのものの病原因子についてみることにする。これらには菌体内物質として、Lipopoly saccharide (LPS) と Original endotoxin protein (OEP) の複合体である Endotoxin, Slime, 菌体外産生物質として外毒素 Exotoxin A, 蛋白分解酵素の Protease, Elastase, Collagenase および Leucocidine, Hemolysin, Lethicinas などがある。これらのうちでも、角膜潰瘍形成における病原因子であることが実証

されている Protease, Elastase などの外酵素⁸⁾は、眼内炎においても、感染拡大や組織障害において、何らかの役割を担っている可能性がある。これをみるためには、Protease, Elastase の硝子体内単独投与による網膜毒性なども検討されてよい。著者ら⁹⁾は緑膿菌性眼内炎に対する免疫療法として、抗 OEP, 抗 Protease, 抗 Elastase, 抗 Exotoxin などの抗体を硝子体内注入して、その有効性を報告中である。

ここで緑膿菌の硝子体内感染型の眼内炎の特徴について、前房水感染型との比較をしながら考察を加えてみたい。今回、弱毒株を硝子体に接種すると菌 5 個(理論値)で、全眼球を膿瘍と化し、網膜機能をほぼ破壊する病原性を示した(図 2, 3)。他方、前房内には同じ菌株を 5×10^7 個接種しても 10 眼全てが硝子体膿瘍とはならず網膜にも殆ど変化をもたらしなかった事実⁷⁾の差は驚くべきである。なぜに硝子体では菌 5 個で全眼球炎となり、前房では 5×10^7 個でも治癒してしまったのか。

これに答えるには硝子体と前房水の免疫学的環境を中心に比較する必要があると思われる。緑膿菌など一般化膿菌に対する生体防御反応は液性免疫が主体である。中心は多形核白血球による菌の phagocytosis と考えられ、抗体や補体に関与していると考えられる。所が硝子体には通常上記の液性免疫を担う成分は殆ど存在しない。硝子体は無血管組織であり、硝子体膜を境に周囲組織と接して、液性免疫から隔絶されている。他方、前房水は血管に富む虹彩・毛様体と直接接し、白血球の遊走や免疫グロブリン、補体など蛋白の漏出が起り易く、しかも常に流れを持つ。このような両者の環境を比べると、前房水に比べて硝子体がいかに化膿菌に対して無防備であるかが理解される。事実、前述したごとく緑膿菌は硝子体内では培地内と同様の増殖を示した。従って以上のことは、微量の弱毒菌であっても、一旦硝子体に入れば眼内炎をおこし得る可能性を示唆している。Valenton ら¹⁰⁾や Forster ら¹¹⁾の報告にみるごとく Staph. epidermidis などの弱毒菌による眼内炎の報告例は少なくない。

また結膜炎、角膜炎など他の眼感染症の起炎菌は、組織親和性などから一定の顕著な傾向を示すことが多い。一方、眼内炎の起炎菌統計は症例数が少ない点を考慮しても、一般に顕著な傾向をみとめ難いのが特徴で、その構成菌は極めて多彩である^{1,2,3,11)}。このような

起炎菌の多彩性は眼内炎という疾患の一つの特徴を示しているように思われる。この傾向は、眼内感染というより大きな偶発性、並びに、硝子体は微量な弱毒菌に対しても極めて無防備であるという今回の知見によって裏付けられるかもしれない。今後、緑膿菌以外の病原性の比較的弱い他菌種についても、今回と同様な実験的検討が必要と思われる。

(本稿の一部は、昭和 57 年第 86 回日本眼科学会総会にて口演された。)

文 献

- 1) 大石正夫他：眼感染症における原因菌の変遷。眼科 16: 639—646, 1974.
- 2) 吉武季子他：全眼球炎および眼内炎の 20 例。臨眼 35: 299—302, 1981.
- 3) 秦野 寛他：全眼球炎の統計的観察。リムルス・テストについて。臨眼 36: 806—807, 1982.
- 4) Maylath FR, et al: Study of experimental intraocular infection. I. The recoverability of organisms inoculated into ocular tissues and fluids. II. The influence of antibiotics and cortisone, alone and combined, on intraocular growth of these organisms. Am. J Ophthalmol 40: 86—101, 1955.
- 5) Tucker DN, et al: Experimental bacterial endophthalmitis. Arch Ophthalmol 88: 647—649, 1972.
- 6) 小川 武他：実験的緑膿菌性眼内炎における眼内細菌数の動態。第 13 回緑膿菌研究会講演記録, 13, 13—15, 1979.
- 7) 秦野 寛：緑膿菌性眼内炎の実験的研究—前房内接種における菌株と病原性について—。日眼会誌 86: 839—845, 1982.
- 8) Kawaharajo K, et al: Corneal ulcers caused by protease and elastase from *P. aeruginosa*. Jap J Exp Med 44: 435—442, 1974.
- 9) 秦野 寛他：ウサギ緑膿菌性眼内炎に対する抗緑膿菌免疫グロブリンの硝子体内注入。日眼会誌 92(12)印刷中。
- 10) Valenton MJ, et al: Staphylococcus epidermidis (albus) endophthalmitis. Arch Ophthalmol 89: 94—96, 1973.
- 11) Forster RK, et al: Further observations on the diagnosis, cause, and treatment of endophthalmitis. Am. J. Ophthalmol 81: 52—56, 1976.

(第 86 回日眼総会原著)