14 - (578)

角膜内皮に対する紫外線の影響(図7,表1)

浅 野 良 弘·水 野 勝 義 (東北大学医学部眼科学教室)

The Effect of Ultraviolet Irradiation on the Corneal Endothelium

Yoshihiro Asano and Katsuyoshi Mizuno

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

要 約

紫外線の角膜内皮細胞に対する障害を紫外線の波長別に検討するため、白色家兎の角膜に紫外線ランプで波 長365nm (UVA)、312nm (UVB)、254nm (UVC)の紫外線を照射し、走査型電子顕微鏡で観察した。自然 の状態で太陽より常時被曝する UVA の波長では角膜内皮細胞には変化がみられず、それより短かい波長の UVB、UVC の波長の紫外線で核の膨化、細胞膜の破綻などの障害がみられた、(日眼 92:578-583,1988)

キーワード:角膜内皮,紫外線波長,スペキュラーマイクロスコープ,走査型電子顕微鏡

Abstract

Corneal endothelial damage by the ultraviolet irradiation was experimentally examined using ultraviolet lamps of three different wave lengths of 365nm, 312nm, and 254nm respectively. Ultraviolet light was applied in vivo and in vitro on the albino rabbit from both the epithelial and endothelial side of the cornea, after confirming that there was no abnormality in either endothelial arrangement or density by specular microscopy. In the in vivo experiment, the ultraviolet lights were irradiated from a distance of 25cm from the cornea, while in the in vitro experiment, the ultraviolet lights were irradiated directly onto the endothelium with the cornea placed upsidedown in balanced salt solution. The cornea was prepared for scanning electron microscopy. With application of 312 and 254nm ultraviolet light, disrupted cell membranes and swollen nuclei which were extruded from the posterior surface of the corneal endothelium were observed. There was no significant change after irradiation with ultraviolet light of 365nm. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 578-583, 1988)

Key words: Coneal endothelium, Ultraviolet wavelength, Specular microscope, Scanning electron microscope

I 緒 言

紫外線による角膜上皮障害は古くから注目され,障 害を起こす波長や線量について報告されている¹¹².し かし角膜内皮細胞に対する影響については,角膜内皮 細胞の障害についての今日のような概念が確立してい なかったためか,生体で有効な観察手段がなかったた めか,実質の浮腫と混濁の程度からその障害が推測さ

別刷請求宛先:980 仙台市霊屋下7-2-601 浅野 良弘 Reprint requests to: Yoshihio Asano M.D. 7-2-601 Otamaya-shita Sendai 980 Japan (Accepted August 27, 1987)

れているのみであった.

近年スペキュラーマイクロスコピーにより溶接工の 角膜内皮に変化がみられる事が報告され,紫外線が角 膜内皮細胞に何らかの影響を与える事が示された。溶 接光には種々の波長の紫外線が含まれており,どの波 長の紫外線が障害を及ぼすか興味が持たれるところで あるが波長別の紫外線による角膜内皮障害を検討した 報告は我々の知る限りまだない.

(昭和62年8月27日受付)

昭和63年4月10日

角膜内皮障害がどの範囲の波長の紫外線被曝によっ ておきるものか家兎角膜に紫外線照射を行ない,実験 により検討した.

II 方 法

実験1

体重1.7から2.2kgの白色家兎6羽を用いた.少なく とも角膜中央部の内皮には脱落,形状変化などの異常 のない事を確認するため, 甲南キーラー社製スペキュ ラーマイクロスコープを用いてスペキュラーマイクロ スコピーを行なった、この際撮影したフィルムは後に 同じ条件で撮影した血算板を用いて, fixed frame 法で 密度を計算した.家兎を固定台に固定し、あらかじめ 線量を測定した紫外線ランプで紫外線照射を行なっ た. 紫外線ランプは Spectronics 社製(365nm, 254nm) および Vilber 社製 (312nm) で, Kipp & Zonen 社製 calibrated thermopile を用いて空気中で各距離にお ける線量を実測して使用した。照射した紫外線は365 nm, 312nm, 254nm の波長で照射は25cm の距離から 行ない, 照射した総線量が2.16x10⁹erg/cm², 2.16 x10¹⁰erg/cm²の2つとなるまで(365nm で3時間およ び30時間, 312nm, 254nm で2時間および20時間)と した. 照射をしない他眼は眼瞼を縫合し, 照射を受け ないようにして対照とした.細胞の変化が十分に起き た後になるよう,照射終了6時間後に眼球を摘出し, 手術用顕微鏡下で角膜を内皮に触らないよう注意しな がら角膜輪部で切開し、2.5%グルタールで固定、アル コール脱水,日立 HCP-1 で臨界点乾燥,EIKO 1B-3 を 用いて金蒸着後に日立S-450型走査型電子顕微鏡で内 皮細胞を観察した. これらは Kodak Tri-X フィルム で撮影した.

実験 2

実験1と同様にして、角膜中央部内皮に異常のない 事を確認した白色家兎の角膜を取出し4分割後、ガラ スシャーレ中の Balanced salt solution[®](以下 BSS [®])50ml 中に内皮面を上にして浸し、4個ずつの角膜 片に対し実験1で使用したものと同じ紫外線ランプ で、波長365nm 312nm および254nm の紫外線を暗室 中で7cm の距離から内皮側より照射,一定時間毎に取り 出して同様に走査型電子顕微鏡で観察した。紫外線の 線量は予め実験1と同様にして測定した。取り出した それぞれの時間で受けた線量を表1にしめす。紫外線 ランプに長さがあるためか、実験1での実測値から理 論的に計算した線量とこれらの実測値は一致しない。 15 - (579)

表1 線量

照射時間	波長254nm	波長312nm	波長365nm
60分	1.17×10^{9}	1.17×10^{9}	0.87×10^{9}
100分	1.95×10^{9}	1.95×10^{9}	1.44×10^{9}
120分	2.34×10^{9}	2.34×10^{9}	1.74×10^{9}
140分	2.73×10^{9}	2.73×10^{9}	2.02×10^{9}
360分	7.02×10^{9}	7.02×10^{9}	5.19×10^{9}

単位; erg/cm²

ガラスシャーレは床面から約1mの距離に固定し,反 射した紫外線の影響が小さくなるようにした.BSS[®] は照射中特に通気などは行なわなかった.対照として, 紫外線を照射しない角膜2個ずつをBSS[®]中におき, 同様にして内皮を観察した.実験中の室温は空調によ り一定とした.その実測値は21.5℃から22.5℃,BSS [®]の液温は22.5℃から22.7℃であった.時間は0分を それぞれ対照とし,1時間,2時間,6時間目に観察 した.さらに波長254nmの紫外線については,100分, 120分,140分後にそれぞれ観察した.このうち120分後 の角膜は光学顕微鏡用にフォルマリン固定,脱水,薄 切の後 HE 染色にて観察した.走査型電子顕微鏡の写 真上で fixed frame 法で細胞密度を計算した.

III 結 果

実験1

紫外線照射前に行なったスペキュラーマイクロスコ ピーでは、角膜内皮細胞密度は、1700ないし1900個/ mm²で、脱落した細胞群や細胞の配列の乱れはなかっ た.波長365nmの紫外線を照射した角膜内皮は2.16 x10⁹erg/cm²および2.16x10¹⁰erg/cm²照射後共に、前 房側の細胞膜および細胞間結合に control に比べ変化 がなかった.波長312nm、254nmの紫外線2.16x10⁹ erg/cm²の照射後、細胞膜が破綻し、膨化した核が露出 した内皮細胞群が散在して観察された(図1).

実験 2

対照実験では時間と共に microvilli の数の減少がみ られた以外6時間目までは走査型電子顕微鏡による観 察では,内皮細胞に変化はみられなかった(図2).波 長365nm の紫外線を照射した場合にもほぼ同様で,6 時間目までは内皮細胞に著変はみられなかった(図 3).

一方波長312nm, 254nmの紫外線を照射すると, 2 時間目(線量にして2.34x10⁹erg/cm²)から内皮細胞の 前房側に球形の突出物を認め, 6時間目にはこの球形 16 - (580)



図1 In vivo で家兎眼へ UVA, UVB, UVC を照射した際の走査型電子顕微鏡写真. 左:正常家兎角膜内皮,細胞密度は約1700個/mm²でほぼ六角形の均一な大きさの内皮細胞が並んでいる. 中左:UVA 2.16×10¹⁰erg/cm²照射後,特に変化を認めない,細胞密度は約1900個/mm². 中右:UVB 2.16×10⁹erg/cm²照射後,膨化して露出した核を持つ内皮細胞群が島状に認められる. 右:UVC 2.16×10⁹erg/cm²照射後,UVB 照射後と同様の変性した内皮細胞群が認められる.



図2 In vitro, BSS 中での照射実験の走査型電子顕微鏡写真. control. 1時間目から microvilli が減少するが, それ以外6時間目まで特に変化を認めない.



図3 BSS 中で UVA を照射した際の走査型電子顕微鏡写真,図2の control の結果と比べて差がない.

昭和63年4月10日



図4 BSS 中で UVB を照射した際の走査型電子顕微鏡写真,照射2時間,線量2.34×10⁹erg/cm²で角膜内皮細胞表面から球形の突出がみられる.照射6時間目で実験1(図1)でみられたような細胞膜の破綻した変性細胞が出現している.



図5 BSS 中で UVC を照射した際の走査型電子顕微鏡写真,UVB を照射した際の走査型電子顕微鏡写真(図4)と同様の変性細胞が認められる。



UVC control

UVC 100 min.

UVC 120 min.

UVC 140 min.

図6 In vitro, BSS 中で UVC を照射した際の走査型電子顕微鏡写真. 図4 および図5 でみられた内皮細胞の前 房側への球状の突出は、100分からみられる線維状の突出(右上)にはじまり120分後位から球形になり(左下)、 140分後には崩壊する(右下).140分(右下)の写真中央部にみられる細胞膜の破綻した変性内皮細胞は、in vivo で UVB および UVC を照射した際にみられる変化(図1)と同様のものである.



図7 BSS 中で UVC 照射120分後の矢状断.(×1000 HE 染色)角膜内皮細胞より前房側へ突出する線維状の物 質は細胞質と同じくエオジン好性である.

の突出は崩壊,同時に細胞膜の一部破綻した像が観察 された(図4,5).

波長254nm の紫外線を照射して,100分から140分ま でを20分毎に観察すると,内皮細胞膜からはじめ繊維 状に長く突出がみられ、これがやがて球形になり,140 分後には崩壊してクレーター状になった(図6).この 140分照射後の走査型電顕写真中央部には細胞膜の破 綻した数個の細胞群がみられる.

走査型電子顕微鏡写真上の細胞密度は1平方mm あたり4400から6000個とばらつきがみられた。

光顕切片では,核の大きさ,形はほぼ正常と思われ たが,走作型電顕写真でみられた突出は内皮細胞の細 胞質と連続して同じくエオジンによく染まりながら前 房側に突出していた(図7).

IV 考 按

電気性眼炎における角膜障害は365nmから350nm の波長でも、おきるとされているが、最も障害が大き いのは288nmの波長で、線量の値は0.15x10⁶erg/cm² と報告されている¹⁾.しかし、これまでの報告では単に "角膜障害"あるいは"上皮障害"としてのみ表現され、 内皮障害に関してはほとんどふれられていない.1968 年, Maurice の報告"以前は生体で有効な角膜内皮の 観察手段がなく,また今日のように角膜内皮への障害 が重要視されていなかったためと考えられる.わずか に電気性眼炎に際して角膜実質に浮腫がみられ,この 事より角膜内皮にも何らかの障害が及んでいる事が推 測されていたにすぎない²⁾.

紫外線による角膜障害として、アーク溶接による上 皮障害がよく知られている。一方、近年 specular microscopy を用い溶接工の角膜内皮で非六角形の細 胞の出現頻度の増加のみられる事が報告された³⁰.し かしアーク溶接灯にはあらゆる波長の紫外線が含まれ ており、どの波長の紫外線によって障害が起こされる かは明らかではない.

紫外線はその波長によって UVA (320~400nm), UVB(280~320nm), UVC(280nm 以下)に分けられ, 通常の屋外で被曝するのは、このうち UVA である。 UVC は通常大気のオゾン層で吸収され,地上には到 達しない。UVB はオゾン層の状態などにより場合に よって地上まで到達し雪焼けや日やけなどの皮膚の変 化や雪眼を起す事が知られている⁵⁾.

これらの3波長帯の紫外線による内皮障害をそれぞ れ検討するため in vivoの実験1を行なった.使用し た家兎角膜は内皮細胞密度が1700ないし1900個/mm² とほぼ一定していた.家兎角膜内皮は細胞分裂像が認 められる点ヒト角膜内皮と異なっており,損傷が修復 されてしまうため細胞が脱落しても,細胞密度の変化 によって内皮細胞の障害をとらえる事はできない.ま た走査型電子顕微鏡を用いた場合,資料作成時,臨界 点乾燥の際に試料が収縮し,この収縮の割合も一定せ ず⁶⁾,内皮細胞密度によって障害をとらえる事はむず かしい.このため今回の実験では走査型電子顕微鏡を 用いて細胞の微細構造の変化から紫外線による障害を 検討した.この結果,UVAの波長ではほとんど変化を 認めないのに対し,UVB,UVCの波長では細胞膜が破 れて膨化した核が露出した変性像を認めた.

さらにこの変性像が紫外線によるものであることを 確認する目的で, BSS[®]中で in vitro の実験2を行 なった。谷島らによれば、BSS ®灌流下で家兎角膜内皮 は8時間まで正常の形態を示すとされる".今回の実 験では灌流は行なわなかったが、6時間目で家兎角膜 内皮は走査型電子顕微鏡写真上変化を示さなかった. 紫外線照射を行なった結果, UVA では変化がない一 方、UVBとUVCでは同じ形態の、HE染色で細胞質 と同じ染色性の突出が内皮細胞前房側へ線維状に認め られた.この線維状の突出が、細胞膜が破綻して細胞 質が前房に出たものか,あるいは細胞膜と共に突出し たものか、今回の実験のみからは不明であるが、時間 経過と共に線状から球状へと変化し細胞膜を通過した 胞体である可能性があり、 今後透過型電顕にて観察す る予定である.また,140分照射後の走査電子顕微鏡写 真中央部に認められた細胞膜の破綻の像は細胞群が島 状に散在する点でも実験1でみられたもの類似してお り,実験1でみられたこの内皮細胞の破壊像は紫外線 によるものと考えられる.

これらの変性した細胞群は一様に分布せず,島状に 散在しているが,細胞によって感受性が違うためか或 いは何らかの原因で照射が一様でなかったためか不明 である.また実験2の線維状の突出は実験1ではみら れないが,上皮側からの紫外線照射であるためかある いは照射後に時間をおいたためか今回の実験からは不 明である.

今回の実験では浮腫のため行なえなかったが、スペ キュラーマイクロスコピーが可能ならば、これらの内 皮細胞の変化は non reflecting area として観察され、 時間経過を追って細胞の脱落に至るものと考えられ る. ヒト角膜に同様の変化がおきた場合,内皮修復が 終了すれば細胞面績の増大,形の不整化に至るものと 考えられる.

角膜は300nm 以上の可視光線及び紫外線を透過し これ以下の波長の紫外線は吸収する。角膜を透過する UVAによって内皮に障害が起きずに,透過しない UVBないしUVCによって障害が起きることから,角 膜で吸収される紫外線が角膜内皮細胞に作用しこのよ うな障害を引起こすものと考えられる。

今回,家兎角膜で,UVB以下の波長の紫外線被曝に より急性に角膜内皮の変性脱落が認められた事は,人 工の短波長の紫外線,あるいは場合によって,雪眼を 起させるような自然の紫外線により角膜内皮障害が起 きる可能性を示しており,これらの被曝に対して,十 分注意を払う必要があると考える.

結 語

家兎角膜に紫外線を照射し走査型電子顕微鏡で内皮 細胞を観察した。

紫外線による障害は UVB(波長320~280nm), UVC (波長280nm 以下)によってみられ, UVA(波長360nm ~400nm) によっては認められなかった.

紫外線は短波長のものが角膜内皮に障害を及ぼすも のと考えられる。

(稿を終えるにあたり,御校閲頂いた当教室玉井 信教授 に深く感謝致します.)

文 献

- 唐井一郎他:紫外線による角膜内皮の変化.日眼 88:948-953,1984.
- Cogan DE, Kinsey VE: Action spectrum of keratitis produced by ultraviolet radiation. Arch Ophthalmol 35: 670-677, 1946.
- Duke-Elder: System of ophthalmology, Abiotic Lesions, 7: 912-928, Mosby Co, St Louis, 1962.
- Maurice DM: Cellar membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. Experimentia 24: 1094, 1968.
- 5) 島崎達夫:成層圏オゾン.東京大学出版会,東京, 1979.
- (5) 矢野真知子,谷島輝雄:家兎角膜内皮細胞の標本 作成過程での収縮.日眼会誌 89:235-238,1985.
- 7) 谷島輝雄,沢 充:眼内灌流液と角膜内皮,眼科 臨床医報 75:1189-1196,1981.