

細胞外間質に対する家兎培養角膜内皮細胞の伸展について

—各種灌流液の影響—(図5)

西田 輝夫・大鳥 利文 (近畿大学医学部眼科学教室)

The Effects of Intraocular Irrigating Solutions on the
Spreading of Cultured Rabbit Corneal Endothelial
Cells on Extracellular Matrices

Teruo Nishida and Toshifumi Otori

Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine

要 約

角膜内皮の創傷治癒において内皮細胞の伸展は重要な治癒機転の一つである。各種眼内灌流液の角膜内皮修復に対する影響を検討するために、フィブロンectin、ラミニンやコラーゲンなどの細胞外間質上で家兎角膜内皮細胞が伸展する時に灌流液の存在がその伸展にどのように影響するかを検討した。培養した家兎角膜内皮細胞を各種灌流液(オペガード® MA, BSS®, BSS®プラス, ラクテック®, 生理食塩水)中に浮遊させ、あらかじめフィブロンectin, ラミニン, コラーゲンI型およびIV型でコートしたプラスチック培養皿上に播種した。37°Cで45分間培養した後、固定・染色し、写真撮影後、細胞の伸展面積をdigitizerにて測定した。角膜内皮細胞は用いた灌流液にかかわらず4種の細胞外間質に反応し、特にフィブロンectinに最も良く反応した。フィブロンectinあるいはラミニンを基質とした場合、オペガード® MA および BSS®プラスの存在下で細胞は最も大きく伸展した。コラーゲンI型に対してはオペガード® MA, BSS®プラスおよび BSS®の存在下で大きく伸展した。コラーゲンIV型の上では、オペガード® MA の存在下で伸展の促進が認められた。これらの結果から、家兎培養角膜内皮細胞は種々の細胞外間質(フィブロンectin, ラミニン, コラーゲン)に対する受容体を有し、これらの細胞外間質に反応して大きく伸展することが明らかとなった。角膜内皮細胞はこれらの細胞外間質の上で伸展する時、オペガード® MA が最も良い環境を与えることが明らかとなった。眼内手術に用いる眼内灌流液としてオペガード® MA および BSS®プラスはともにきわめて有用であることが明らかとなった。(日眼 92:843—849, 1988)

キーワード：眼内灌流液，角膜内皮細胞，細胞伸展，細胞外間質，創傷治癒

Abstract

The spreading of corneal endothelial cells is one of the important mechanisms of the wound healing of the corneal endothelium. To investigate the effects of intraocular irrigating solutions on the wound healing of the corneal endothelium, we measured the spread area of cultured rabbit corneal endothelial cells on various extracellular matrices (fibronectin, laminin, collagen type I and IV) in the presence of the intraocular irrigating solutions (Opeguard® MA, BSS®, BSS® Plus, Lactec® and saline). Cultured corneal endothelial cells responded and spread well on these extracellular matrices. On the fibronectin or laminin matrix, the area of the spread cells increased in the presence of

別刷請求先：589 大阪府大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部眼科学教室 西田 輝夫 (昭和63年2月1日受付)
Reprint requests to: Teruo Nishida, M.D., D. Sc. Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine

377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama City, Osaka 589, Japan

(Accepted February 1, 1988)

Opeguard® MA and BSS®. On collagen type I, the cell area significantly increased in the presence of either Opeguard® MA, BSS® or BSS® Plus. On collagen type IV, only the presence of Opeguard® MA stimulated the spreading of the cells. These results demonstrated that the rabbit corneal endothelial cells could respond to the extracellular matrices and that the presence of Opeguard® MA or BSS® Plus provided favorable conditions for the spreading of corneal endothelial cells. The present results also suggested that both Opeguard® MA and BSS® Plus are beneficial for spreading of corneal endothelial cells during wound healing after intraocular surgery. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 843—849, 1988)

Key words: Intraocular irrigating solutions, Corneal endothelial cells, Cell spreading, Extracellular matrix, Wound healing

I 緒 言

白内障手術、角膜移植術あるいは無水晶体眼における硝子体手術等において、内皮細胞の損傷の程度は術後の成績を決定する大きな因子である。ヒトにおいて角膜内皮細胞は増殖せず、新しく細胞数が増加することはない。種々の眼内手術に伴い角膜内皮細胞が障害された場合、欠損・脱落した部位に対して隣接する周辺の内皮細胞が伸展・移動し、欠損した部分を覆うことにより修復する¹⁾²⁾。一方、近年眼内手術に際して、種々の眼内灌流液が臨床的に用いられている。水川らの人工房水についての研究に始まり³⁾、大鳥らは前房水のイオン組成ときわめて類似した眼内灌流液を開発するという観点からオベガード® MA(S-MA2)を開発した^{4)~7)}。米国においても Edelhauser らは、BSS®あるいは BSS®プラスなどの灌流液を開発した⁸⁾⁹⁾。臨床的にもオベガード® MAあるいは BSS®プラスが有用であることが報告されている^{10)~16)}。これらの眼内灌流液が角膜に対してどのような影響を与えるかという点について多くの研究がなされているが、基本的に従来の研究は灌流液を用いることによって角膜内皮細胞がどの程度障害されるかという観点からのみなされてきている⁸⁾⁹⁾¹⁶⁾。前述のように角膜内皮細胞の修復は、損傷部周辺の細胞の伸展および移動によるが、一般に細胞が伸展する際、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン I 型あるいはコラーゲン IV 型などの足場となる細胞外間質 (extracellular matrix) がきわめて重要な役割を果たしている¹⁷⁾。

損傷部で観察されるように内皮細胞が伸展する時に、これらの眼内灌流液が角膜内皮細胞の伸展にどのような影響を与えるかを知ることを目的として本研究を行った。この目的のために、培養した家兎角膜内皮細胞を用いて、角膜内皮細胞がフィブロネクチン、ラ

ミニンあるいはコラーゲンなどの細胞外間質の上で伸展する時に、各種の灌流液が細胞伸展に対してどのような影響を与えるかを検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

本研究に用いた灌流液はオベガード® MA (千寿製薬)、BSS®プラス (アルコン社)、BSS® (アルコン社)、乳酸リンゲル (ラクテック®, 大塚製薬) および生理食塩水 (大塚製薬) である。フィブロネクチンは既報のごとくクエン酸添加家兎血漿より、ゼラチン結合セファロース 4B 親和性カラムクロマトグラフィーを用いて精製した¹⁸⁾。EHS sarcoma より精製したマウスのラミニンは Collaborative Research 社より購入した。酸可溶性コラーゲン I 型 (Cellmatrix Ia®) および牛水晶体嚢由来コラーゲン IV 型 (Cellmatrix IV®) は新田ゲラチン社より提供された。培養用 96穴 multiwell プレートはファルコン社のものを用いた。体重 2.5 から 3kg の白色家兎は栗津実験動物より購入した。

2. 角膜内皮細胞の培養

白色家兎をペントバルビタールで屠殺したのち眼球を摘出した。その後角膜を摘出し内皮細胞と共にデスメ膜を剝離した。剃刀で細切した後、15% 牛胎児血清を含む培養液 (TC199) で培養した。2 週間後に角膜内皮細胞はデスメ膜から outgrowth して confluent な状態になった。培養皿からデスメ膜の断片を取除いた後さらに内皮細胞をトリプシンで処理して単細胞浮遊液を調製し継代培養した。実験の時には単層培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄後トリプシンで剝離し家兎角膜内皮細胞の単細胞浮遊液を作成した。細胞数は血球計算板を用いて測定した。

3. 細胞伸展の測定

家兎血漿フィブロネクチン、ラミニン、酸可溶性コ

ラーゲン I 型, コラーゲン IV 型 ($50\mu\text{g/ml}$) を 96 穴プラスチック培養皿の各穴に $75\mu\text{l}$ ずつ分注し室温にて 60 分間プラスチック表面に吸着させた。その後血清を含まない TC199 で十分に洗浄した。前述のように家兎角膜内皮細胞の単細胞浮遊液を調製した後遠心にて異なる 5 種の眼内滲出液で洗浄し、種々の滲出液中の浮遊液 (1×10^6 細胞/ ml) を作成した。あらかじめ 4 種類の細胞外間質でコートしたプラスチック培養皿の各穴に家兎角膜内皮細胞 (1×10^4 細胞/穴) を播種し 45 分間 37°C で incubate し、細胞を伸展させた。反応終了後 10% 中性ホルマリンで細胞を固定し流水にてホルマリンを除去した後、1% クリスタルバイオレット (95% エタノール中) で 10 分間染色した。位相差顕微鏡で細胞の形態を観察し写真を撮影した。一定の倍率で印画紙に写真を焼きつけた後 digitizer で最低 100 個以上の細胞について細胞面積を測定し、平均細胞面積を算出した。全ての実験成績は 6 回の実験の平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.M.) で表した。統計的処理は Student t-test にて行った。

III 結 果

角膜内皮細胞をフィブロネクチン, ラミニン, コラーゲン I 型あるいはコラーゲン IV 型のマトリックスの上で、反応させた時の細胞の伸展の形態変化を図 1 に示す。角膜内皮細胞を何もコートしていない無処理のプラスチックの上で反応させると小さな丸い細胞として接着しているのみで、細胞の伸展は認められなかった。プラスチック培養皿をフィブロネクチンでコートすると細胞は大きく伸展しているのが観察された。ラミニンでプラスチックをコートした場合でも角膜内皮細胞は大きく伸展した。コラーゲン I 型でコートしたプラスチック培養皿の上では細胞は伸展するが、その伸展の程度はフィブロネクチン, ラミニンあるいはコラーゲン IV 型に比してやや小さかった。コラーゲン IV 型でコートしたプラスチックの培養皿の上では、内皮細胞は大きく伸展しているのが観察された。このように細胞の形態は用いた細胞外間質によって異なるがフィブロネクチン, ラミニン, コラーゲン I 型あるいはコラーゲン IV 型のマトリックスに対して角膜内皮細胞が反応し伸展することが観察された。

次に各種滲出液の存在下でこれらの 4 種の細胞外間質に対する角膜内皮細胞伸展反応が、どのような影響を受けるかを定量的に検討した。図 2 に示すようにプラスチック培養皿をあらかじめ $50\mu\text{g/ml}$ の濃度の

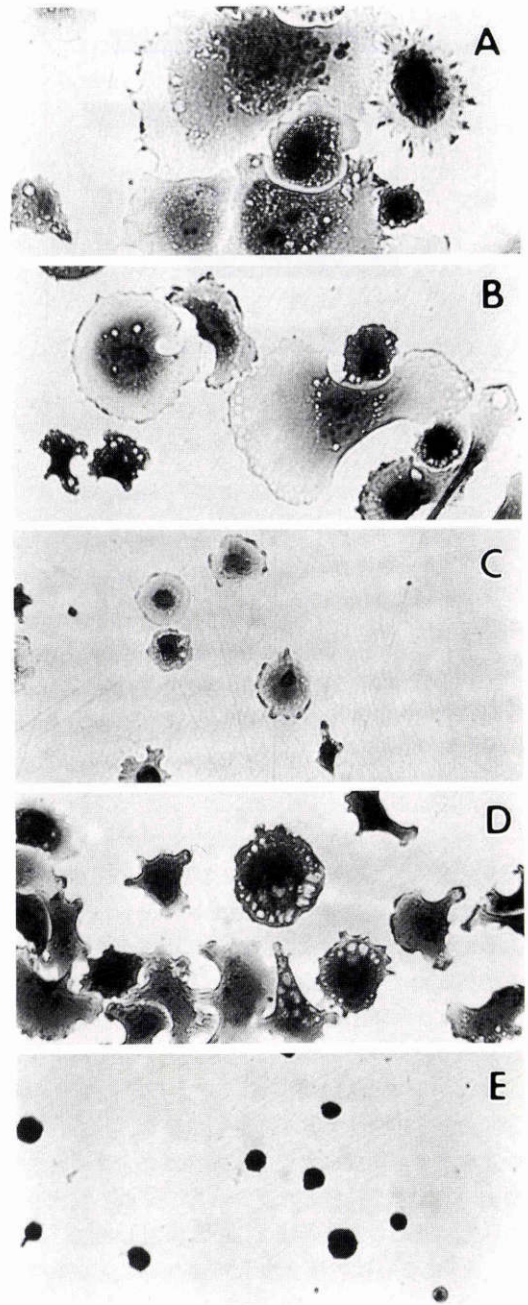


図1 細胞外間質における家兎角膜内皮細胞の形態変化。培養家兎角膜内皮細胞を、フィブロネクチン (A), ラミニン (B), コラーゲン I 型 (C), コラーゲン IV 型 (D) でコートした培養皿上および何もコートしていないプラスチック培養皿 (E) 上に播種し、45 分後に固定染色した後、位相差顕微鏡で観察した。

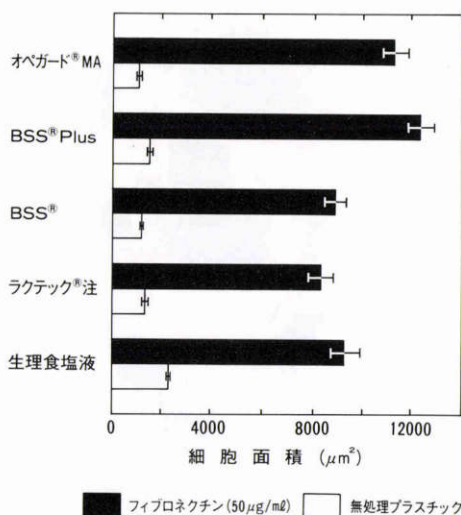


図2 フィブロネクチン上での家兎角膜内皮細胞伸展に対する各種灌流液の影響。フィブロネクチンに対する細胞伸展はオベガード®MAの存在下でBSS® ($p < 0.001$), ラクテック® ($p < 0.001$) および生理食塩水 ($p < 0.01$) に比し有意に伸展していた。BSS®プラスの存在下でBSS® ($p < 0.001$), ラクテック® ($p < 0.005$) および生理食塩水 ($p < 0.05$) に比し有意に伸展していた。

フィブロネクチンでコートさせた。オベガード®MA, BSS®プラス, BSS®, ラクテック®および生理食塩水が存在する条件で角膜内皮細胞をコートしたフィブロネクチン上で反応させた。図2に示すように、無処理の培養皿の上での細胞は用いたどの灌流液が存在する状況でも、平均面積は約1,000 μm^2 で著明な差は認められなかった。一方、フィブロネクチンでコートすると、オベガード®MAが存在している条件では約11,000 μm^2 と細胞は大きく伸展していた。BSS®プラスの存在下でも同様に角膜内皮細胞はフィブロネクチン上で、大きく伸展した。これらの2つの灌流液の間には差は認められなかった。それに対しBSS®, ラクテック®あるいは生理食塩水が存在している条件では細胞はフィブロネクチン上で伸展するが、オベガード®MA, BSS®プラスの時に比較して、約70%程度にしか伸展しなかった。これらの成績は角膜内皮細胞がフィブロネクチンのマトリックスに反応して伸展する時、オベガード®MA およびBSS®プラスの存在がきわめて良い環境を提供することを示している。

ラミニンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でプラスチック培養皿に吸着させたマトリックスの上での角膜内皮細胞の伸

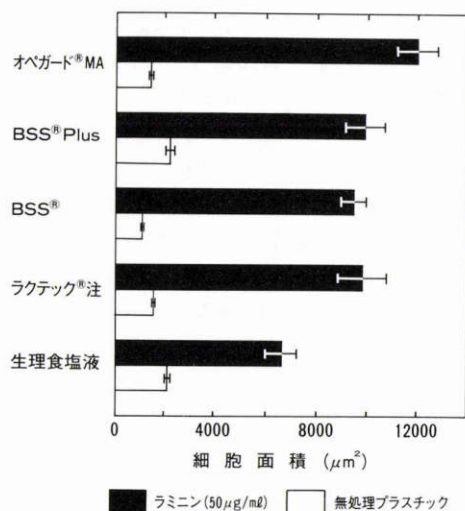


図3 ラミニン上での家兎角膜内皮細胞伸展に対する各種灌流液の影響。ラミニンに対する細胞伸展はオベガード®MAの存在下で、生理食塩水 ($p < 0.02$) に比し有意に伸展していた。BSS®プラスの存在下で生理食塩水 ($p < 0.05$) に比し有意に伸展していた。

展の結果を図3に示す。フィブロネクチンマトリックスの上での成績と同様に、ラミニンマトリックスの上でもオベガード®MAが存在すると細胞面積は約12,000 μm^2 と、大きく伸展していた。それに比しBSS®プラス, BSS®あるいはラクテック®の存在下ではオベガード®MAの存在下での成績の約80%と、細胞の伸展の度合いがやや少ない傾向が認められた。さらに生理食塩水の存在下では細胞の伸展した面積は約50%に減少していた。これらの結果より角膜内皮細胞がラミニンのマトリックスに反応する時には、オベガード®MAの環境が最も良いことが明らかとなった。

コラーゲンI型(図4)あるいはコラーゲンIV型(図5)をコートし、それらのマトリックスに対する角膜内皮細胞の上での反応性を検討した。フィブロネクチンやラミニンと同様にオベガード®MA, BSS®プラスあるいはBSS®が存在する時には、角膜内皮細胞はコラーゲンI型の上で大きく伸展していることが明らかとなった。しかしラクテック®や生理食塩水が存在している条件下では、内皮細胞はコラーゲンI型にはほとんど反応しなかった。一方コラーゲンIV型に対してはオベガード®MAが存在するところでは最も大きな細胞面積を示した。BSS®プラスの存在下では細胞の伸展はオベガード®MAの場合の約80%であり、

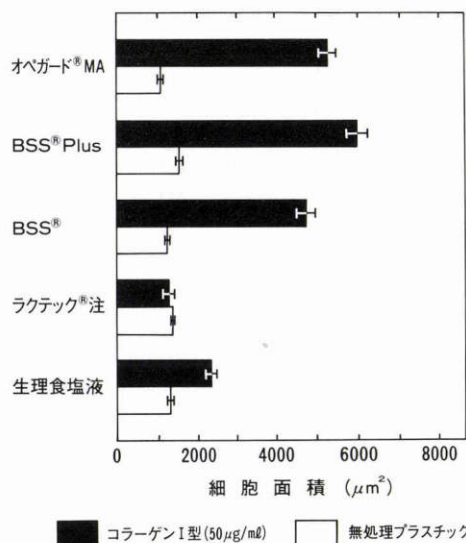


図4 コラーゲンI型上での家兎角膜内皮細胞伸展に対する各種灌流液の影響。コラーゲンI型に対する細胞伸展はオベガード®MAの存在下で、ラクテック® ($p<0.001$) および生理食塩水 ($p<0.001$) に比し有意に伸展していた。BSS®プラスの存在下でオベガード®MA ($p<0.05$)、BSS® ($p<0.05$)、ラクテック® ($p<0.001$) および生理食塩水 ($p<0.001$) に比し有意に伸展していた。BSS®の存在下でラクテック® ($p<0.001$) および生理食塩水 ($p<0.001$) に比し有意に伸展していた。生理食塩水の存在下でラクテック® ($p<0.01$) に比し有意に伸展していた。

BSS®が存在している時には更にそれより少し小さく、細胞の伸展が抑えられた形で観察された。コラーゲンI型のマトリックスに対する時とは異なり、角膜内皮細胞はラクテック®や生理食塩水でもある程度伸展した。

IV 考 按

角膜の内皮細胞は水の代謝に関係し、角膜実質の含水量を調節することにより角膜透明性の維持に重要な役割を演じている。角膜内皮細胞の機能不全や欠損により角膜実質の浮腫が生じ、視力が障害される¹⁾²⁾。一般に細胞が障害された場合、欠損部修復の機序として損傷周辺の細胞の伸展・移動と増殖が考えられる。しかしながらヒトにおいては角膜内皮細胞は増殖しない。したがって損傷部周辺の内皮細胞が伸展・移動し、さらに1個1個の細胞が大きく拡大することによって欠損部を覆い角膜内皮細胞の単層構造を維持し、再び角膜実質の含水量を正常化する¹⁹⁾。細胞が伸展・移動す

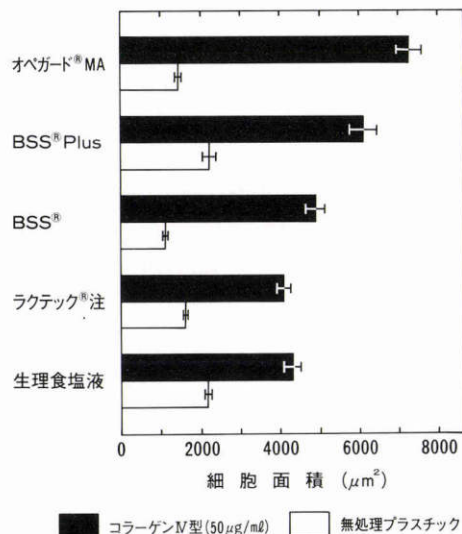


図5 コラーゲンIV型上での家兎角膜内皮細胞伸展に対する各種灌流液の影響。コラーゲンIV型に対する細胞伸展はオベガード®MAの存在下でBSS® ($p<0.001$)、ラクテック® ($p<0.001$) および生理食塩水 ($p<0.001$) に比し有意に伸展していた。BSS®プラスの存在下で、ラクテック® ($p<0.005$) および生理食塩水 ($p<0.02$) に比し有意に伸展していた。

る時にはフィブロネクチン、ラミニンあるいはコラーゲンなどの細胞外間質が大きな働きを演じる。さらに細胞が移動する時の化学的な環境も重要である¹⁷⁾。図1に示すように培養した家兎の角膜内皮細胞は、フィブロネクチン、ラミニン、I型およびIV型のコラーゲンなどの細胞外間質によく反応し、それらの上で大きく伸展する。これらの結果から角膜内皮細胞が伸展する時に細胞外間質がきわめて良好な場を提供すること、および角膜上皮細胞の治癒で見出されたのと同じように²⁰⁾、これらの細胞外間質が角膜内皮細胞の創傷治癒に重要な役割を演じていることが示唆される。

手術用顕微鏡、精巧な手術器具や縫合針の開発により眼内手術手技は飛躍的に改善された。特に白内障の手術においては、眼内レンズの開発とともに手術成績がきわめて良好となってきた。したがって、より良好な術後成績を得るためには白内障摘出術の際に、いかにして角膜内皮細胞を保護するかということが最も重要である。粘弾性物質であるヒアルロン酸の開発と、種々の眼内灌流液の開発が行われてきた。ヒアルロン酸を術中用いることにより手術操作に必要な空間を

確保するのみならず、角膜内皮細胞への物理的侵襲を防止することができる。一方、手術中に用いる眼内灌流液として、大鳥およびEdelhauserは独自にオペガード®MAおよびBSS®やBSS®プラスを開発してきた^{4)~9)}。これらの眼内灌流液の角膜内皮細胞に対する障害はきわめて少ないことが報告されており^{8)~16)}、多くの臨床成績からオペガード®MAもBSS®プラスも眼内手術の際の角膜内皮細胞の消失および障害を最小限におさえ、したがって術後の角膜の透明性を良好に維持していることが明らかにされている。今回の研究から明らかになったように、角膜内皮細胞が細胞外間質に反応して伸展する時に、オペガード®MAやあるいはBSS®プラスが存在するときわめてよく細胞が伸展することが明らかとなった。このことは臨床的にすでに報告されているようにオペガード®MAやBSS®プラスが角膜内皮細胞を障害しないのみならず、手術操作によって避けえないわずかな角膜内皮細胞の消失に反応して損傷部周囲の角膜内皮細胞が伸展・移動し欠損部を再被覆しようとする際にきわめて良好な化学的環境を提供するものと考えられる。しかしBSS®やラクテック®あるいは生理食塩水のみが存在している条件ではこれらの細胞外間質に対する角膜内皮細胞の反応性が乏しいことが明らかとなった。

現在眼内手術に用いられているオペガード®MAあるいはBSS®プラスは、既に報告されているように角膜内皮細胞に対して障害が少ないのみならず、一旦障害された内皮細胞の修復過程で、細胞が細胞外間質に反応して伸展する時にきわめて良い環境を提供するものであると考えられる。角膜内皮細胞の修復、即ち隣接部から欠損部への伸展・移動という観点からは、オペガード®MAとBSS®プラスになんら有意の差異が認められず、共に優れた眼内灌流液である。

本研究は第91回日本眼科学会総会において発表した。

謝辞：本研究の一部は大阪アイバンク研究助成金および近畿大学学内研究助成金によって援助された。酸可溶性コラーゲンI型(Cellmatrix Ia®)および牛水晶体囊由来コラーゲンIV型(Cellmatrix IV®)を提供して下さった新田ゲラチン社に感謝する。近畿大学医学部眼科学教室 池村英則氏の御協力に厚く感謝する。

文 献

- 1) Binder PS, Wickham MG, Zavala EY, et al: Corneal anatomy and wound healing. In Symposium on Medical and Surgical Diseases of the Cornea: Transaction of the New Orleans Acad-

- emy of Ophthalmology, St. Louis, CV Mosby, 1—35, 1980.
- 2) Kenyon KR: Morphology and pathologic responses of the cornea to disease, in Smolin G, Thoft RA (eds): The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice, Second Edition, Boston, Little, Brown and Company, 63—98, 1987.
- 3) 水川 孝, 岸田健一: 人工房水についての研究. 日眼 74: 687—691, 1981.
- 4) 大鳥利文, 法貴 隆, 山本祐二郎他: 眼内手術用灌流液についての研究. 日眼 84: 1272—1277, 1980.
- 5) 大鳥利文, 法貴 隆, 中尾雄三他: 眼内灌流液についての研究. 第2報, 重炭酸イオン濃度についての再検討. 日眼 85: 1237—1242, 1981.
- 6) Otori T, Nakao Y, Ikeda M: Reappraisal of the role of bicarbonate in intraocular irrigating solutions. Acta XXIV Int Cong Ophthalmol 1: 327—329, 1982.
- 7) 大鳥利文, 中尾雄三, 真野富也他: 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-MA2の臨床応用. 日眼 87: 968—973, 1983.
- 8) Edelhauser HF, Van Horn DL, Hyndiuk RA, et al: Intraocular irrigating solutions: Their effects on the corneal endothelium. Arch Ophthalmol 93: 648—657, 1975.
- 9) Edelhauser 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.
- 10) 大鳥利文, 林 文彦, 宮田典男: S-MA2の臨床応用についての研究. 第1報, 超音波白内障手術の角膜に及ぼす影響について. 眼紀 35: 1882—1888, 1984.
- 11) 大鳥利文, 松井瑞夫, 大島健司: S-MA2の臨床応用についての研究. 第2報, 硝子体手術の眼組織に及ぼす影響について. 眼紀 35: 1889—1899, 1984.
- 12) 大鳥利文: S-MA2の臨床応用について. 第3報, 白内障囊内摘出術および緑内障手術への応用. 眼紀 36: 218—221, 1985.
- 13) 村田忠彦, 福本純子, 田浦輝美他: 手術用眼内灌流液 S-MA2 についての臨床的研究. 眼紀 35: 420—422, 1984.
- 14) 松田 司, 田野保雄, 稲葉昌丸他: 新しい眼内灌流液 (S-MA2) を用いた硝子体手術による角膜障害. 眼紀 34: 1424—1428, 1983.
- 15) Benson WE, Diamond JG, Tasman W: Intraocular irrigating solutions for pars plana vitrectomy. A prospective, randomized, double-blind study. Arch Ophthalmol 99: 1013—1015, 1981.
- 16) 谷島輝雄, Takahashi WY, 澤 充: 眼内灌流

液と角膜内皮. 眼臨医 75: 1189—1196, 1981.

- 17) **Hay ED**: Collagen and embryonic development, in Hay ED (ed): Cell Biology of Extracellular Matrix, New York, Plenum Press, 379—409, 1981.

- 18) **Engvall E, Ruoslahti E**: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. Int J Cancer 20: 1—5, 1977.

- 19) **Galin MA, Lin LL, Fetherolf E**, et al: Time analysis of corneal endothelial cell density after cataract extraction. Am J Ophthalmol 88: 93—96, 1979.

- 20) **西田輝夫**: 角膜創傷治癒とフィブロネクチン. 眼科 29: 1241—1249, 1987.

(第91回日眼総会原著)
