

## 家兎角膜上皮細胞に対する緑膿菌の付着について

田 沢 博

新潟大学医学部眼科学教室

## 要 約

角膜感染症の発症には最初に角膜上皮への細菌の付着が必要条件である。緑膿菌性の角膜炎はコンタクトレンズ装用者によく見られる。1週間のハードコンタクトレンズ装用により傷害された家兎角膜上皮に対する緑膿菌の付着について形態学的に検討した。10<sup>8</sup>CFU/mlの緑膿菌浮遊液0.2mlを点眼し、5分、15分、30分、60分後に角膜を摘出し走査型電子顕微鏡を用いて観察した。正常角膜には緑膿菌は付着しなかったが、傷害角膜には付着が認められた。開瞼器を用いて瞬目を不能にした家兎の傷害角膜には角膜上のムチンを介して多数の付着が認められた。緑膿菌点眼30分以降では菌の周囲の上皮細胞およびムチンに陥凹を作り、侵入像が認められた。(日眼会誌 94:269-276, 1990)

キーワード：細菌付着，緑膿菌，家兎角膜上皮，コンタクトレンズ，走査型電子顕微鏡

Adherence of *Pseudomonas Aeruginosa* to the Rabbit Corneal Epithelium

Hiroshi Tazawa

*Department of Ophthalmology, Niigata University, School of Medicine*

## Abstract

Adherence of bacteria to the corneal epithelium is the first step in the pathogenesis of corneal infection. Keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* usually occurs among the contact lens wearers. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to rabbit corneal epithelium, damaged by one week of hard contact lens wear, was examined histologically. The cornea was excised for scanning electron microscopy at 5, 15, 30 and 60 minutes after inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* (0.2ml, 10<sup>8</sup>CFU/ml). *Pseudomonas aeruginosa* did not adhere to the intact corneal epithelium, but traumatized cornea provided a site for adherence. In rabbits in which the eyelid was opened by lid retractors, large numbers of organisms were observed adhering to the injured cornea mediated by ocular surface mucin. Thirty minutes after inoculation, the adherent bacteria began to penetrate the epithelial cells and surface mucin by the formation of pockets surrounding the organism. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94: 269-276, 1990)

Key words: Bacterial adherence, *Pseudomonas aeruginosa*, Rabbit corneal epithelium, Contact lens, Scanning electron microscopy

## I 緒 言

感染の成立には細菌の付着，定着，侵入，増殖の過

程が必要である。最初の段階である付着について腸管，膀胱，気管上皮における研究は多い<sup>1)~4)</sup>。角膜上皮に対する細菌の付着に関しては，角膜の傷害<sup>5)~8)</sup>，ムチ

別刷請求先：951 新潟市旭町通一番町 新潟大学医学部眼科学教室 田沢 博

(平成元年7月11日受付，平成元年9月12日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Tazawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Niigata Univ. School of Med. Ichibancho, Asahimachidōri, Niigata 951, Japan

(Received July 11, 1989 and accepted in revised form September 12, 1989)

ン<sup>9)~10)</sup>などの菌付着促進因子と、涙液、瞬目、ムチン<sup>11)~13)</sup>などの様々な防御因子が知られている。

従来の臨床的経験から、角膜の外傷が緑膿菌性角膜潰瘍の発症に先行していることが多い<sup>14)~15)</sup>。緑膿菌の角膜への感染実験は多数の報告があり、外傷が発症要因の一つとなることが知られている<sup>15)</sup>。角膜上皮にたいする付着実験の報告は少ないが、正常角膜上皮には殆ど付着せず、機械的に作成された種々の傷害上皮に対する細菌の付着についての検討が行われている<sup>5)~8)</sup>。

コンタクトレンズ装用により角膜上皮表層細胞は傷害されるが、基底細胞層、その前方の翼状細胞層、さらにその前方の扁平上皮といった5~7層の細胞をもつ角膜上皮層の構造は保たれている<sup>16)~17)</sup>。緑膿菌性角膜潰瘍の発症誘因として、つき目、角膜異物除去後とともにコンタクトレンズ装用が重要である<sup>18)</sup>。そこで今回、コンタクトレンズによる角膜傷害と細菌付着の関係を知る目的で、コンタクトレンズ装用によって傷害した家兎角膜上皮最表層細胞にたいする緑膿菌の付着について走査型電子顕微鏡を用いて形態学的に検討したので報告する。

## II 実験方法

### 1. 実験動物

体重2~3 kgの日本白色種、成熟家兎12羽、24眼を用いた。角膜を傷害するためにハードコンタクトレンズ(PMMA)を1週間、取りはずすことなく連続装用させた。ハードコンタクトレンズのフィッティングはタイトになるようにベースカーブ7.20mm、サイズ11.0mmのものを使用し、角膜のやや下方に動きは少なく、瞬目によってもはずれずに1週間、連続して装用できた。

### 2. 菌株

角膜潰瘍患者より分離された緑膿菌を使用した。3種類の緑膿菌を用いて以下の実験を行い、そのうち最も多く付着した菌株を使用した。その性状はムコイド型、血清型別B、Elastase(+), Protease(+ )である。

### 3. 方法

角膜の条件として、(1)正常角膜で、瞬目自由、(2)ハードコンタクトレンズを1週間装用し角膜上皮を傷害しもので、瞬目自由、(3)ハードコンタクトレンズを1週間装用し角膜上皮を傷害したもので、開瞼器を用いて開瞼のまま瞬目不能状態にしたもの、以上の3

群で結果を比較した。

緑膿菌を Tryptic soy broth で37°C、20~24時間培養し、10<sup>8</sup>CFU/mlの菌浮遊液とし、0.2mlを角膜に点眼した。(1)、(2)では指で開瞼して点眼したのみであり、(3)では開瞼器で開瞼して約30秒後に点眼し、そのまま眼球摘出まで瞬目不能状態とした。ペントバルビタールで静脈麻酔後、5分、15分、30分、60分後に眼球を摘出した。シャーレ中のPBSで5回振って洗浄後、4%グルタルアルデヒドで3時間、1%オスミウム酸で冷却、振盪しながら2時間、後固定を行い、エタノール系列により脱水しさらに酢酸イソアミルに置換した。これを液状炭酸ガスで臨界点乾燥しイオンコーターを用いて金のスパッタコーティングを施した。以上のように作製した標本を日立430形走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

## III 結果

正常眼(瞬目自由、正常角膜)に緑膿菌を点眼した群には、5分、15分、30分、60分のいずれも緑膿菌の

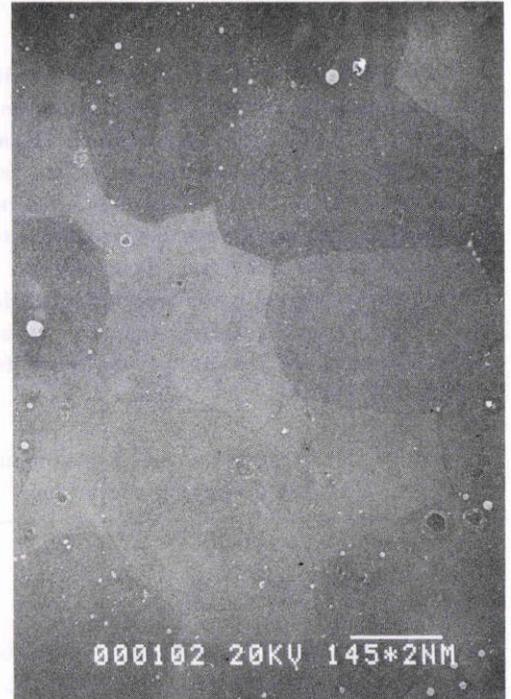


図1 正常角膜に緑膿菌を点眼15分後の角膜上皮、明るい細胞、暗い細胞とその中間の細胞が区別され、菌液によると思われる軽度の傷害が認められるが、緑膿菌の付着は見られない。(×900)

付着は認められなかった。明るい細胞、暗い細胞とその中間の細胞が区別され、菌浮遊液を点眼しなかったものに比べて小さな付着物やクレーター状の変化がやや多く菌液による軽度の傷害と思われた(図1)。

図2は、対照としてハードコンタクトレンズを1週間連続して装用後、緑膿菌を含まないブイオンのみを点眼したものである。ハードコンタクトレンズの1週間連続装用により球結膜の軽度の充血、分泌物の増加が見られた。走査型電子顕微鏡所見では角膜上皮のMicrovilliの減少および消失、細胞膜の変性崩壊、部分的な最表層細胞の剝離、脱落が認められた。角膜に張り付くように存在している粘液層が見られ、薄い部分ではその下のMicrovilliが観察できた(図2)。

瞬目自由、ハードコンタクトレンズによる傷害角膜の群では、5分、15分では数視野に数個の緑膿菌が細胞表面に乗っているという感じで存在していた(図3)。15分は5分よりも減少しており、30分、60分では、

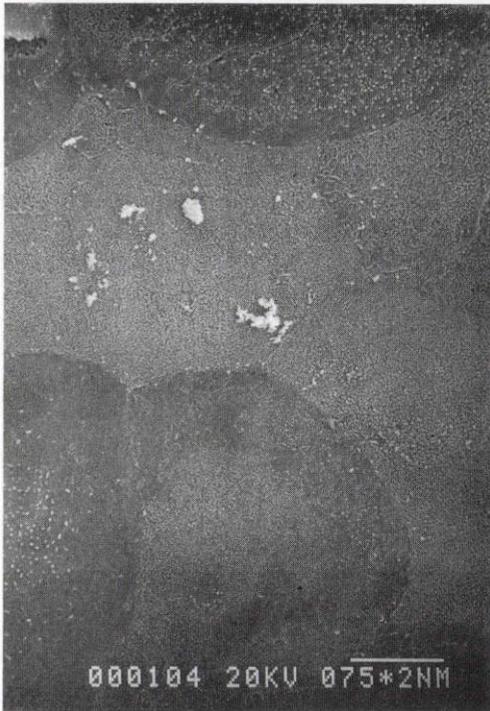


図2 ハードコンタクトレンズを1週間連続装用後の角膜に緑膿菌を含まないブイオンを点眼した。Microvilliの減少および消失、細胞膜の変性が認められた。上方と下方の細胞では張り付くように存在している粘液層が見られ、その薄い部分では下のMicrovilliが観察できる。(×1,700)



図3 瞬目自由、ハードコンタクトレンズによる傷害角膜に緑膿菌を点眼し15分後、ムチンの張り付いた傷害の強い細胞の辺縁に緑膿菌が存在している。矢印で緑膿菌を示す。(×1,700)

さらに減少し殆ど認められなくなった。

開眼のまま瞬目不能状態にしたハードコンタクトレンズによる傷害角膜の群では、多数の緑膿菌の付着が見られた。5分後と15分後の所見は類似していた。傷害の軽い部分では細胞表面に乗っているという感じで存在し、最表層細胞の境界、陥凹のある部分、暗い細胞よりは変形したMicrovilliの多い明るい細胞の部位に付着菌数が多い傾向が認められた(図4)。傷害の強い部分ではムチンが膜状、糸状に存在し、多数の緑膿菌がそれに絡まって存在していた(図5)。菌数は15分でやや減少傾向であった。

30分後と60分後の所見は類似していた。傷害の軽い部分の緑膿菌は一部のムチンの存在部分以外ではほとんど認められなくなった。傷害の強い部分では、ムチンが膜状に張り付くように存在し、ムチン層の薄い部分ではMicrovilliが確認できた(図6a)。緑膿菌は、そのムチンの存在部分に認められるが付着菌数は5、15分より30、60分で減少していた。ムチンの厚い部分、薄くMicrovilliの確認できる部分の両者とも、30分以

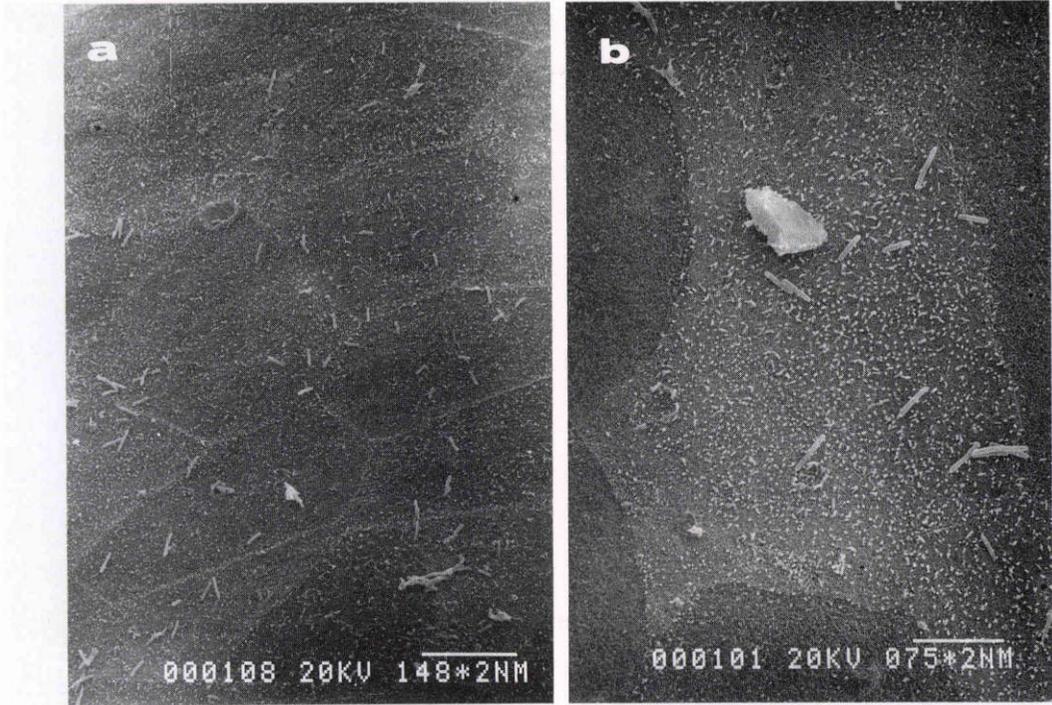


図4

図4 瞬目不能にしたハードコンタクトレンズによる傷害角膜に緑膿菌を点眼し5分後。

a. 比較的傷害の軽い部分にも多数の緑膿菌の付着が見られた。最表層細胞の境界、陥凹のある部分に付着しやすい傾向が見られた。(×850)

b. 暗い細胞よりは変性したMicrovilliの多い明るい細胞に付着しやすい傾向が見られた。(×1,700)

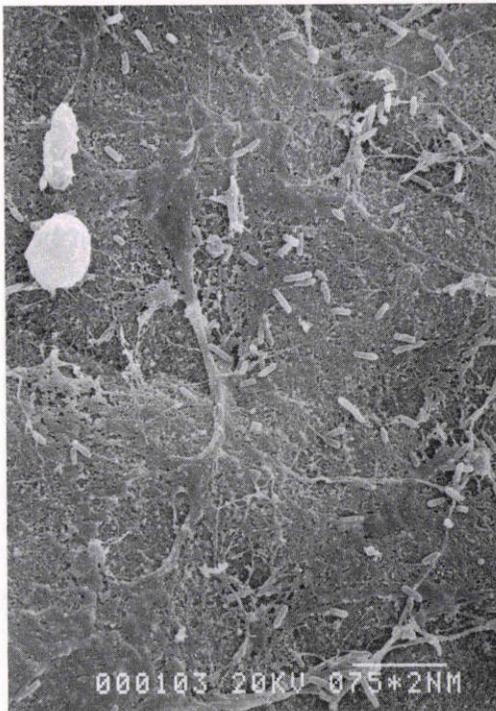


図5

図5 瞬目不能にしたハードコンタクトレンズによる傷害角膜に緑膿菌を点眼し15分後。傷害の強い部分では、ムチンが膜状、糸状に存在し、多数の緑膿菌がそれに絡まって存在していた。(×1,700)



図6 瞬目不能にしたハードコンタクトレンズによる傷害角膜に緑膿菌を点眼し30分後。

- a. ムチンが膜状に張り付くように存在し、その薄い部分では Microvilli が確認できる。多数の緑膿菌が Pit を形成して存在している。(×2,000)
- b. a の右上部分の強拡大。厚いムチンに Pit を形成して緑膿菌が付着している。(×5,300)
- c. a の左下部分(矢印で示す)の強拡大。Microvilli を持った上皮細胞に緑膿菌が Pit を作って侵入している。(×5,300)

降では緑膿菌は Pit を形成しており、侵入像を示していると思われた(図 6b, c)。傷害の軽い部分でも、所どころにムチンが張り付くように存在し、そこには、Pit を形成して緑膿菌の付着が認められた(図 7)。また、付着したムチンの辺縁や上皮欠損部の辺縁に集族して緑膿菌が多く認められた。

#### IV 考 按

緑膿菌性角膜潰瘍は、1950年代より増加し難治性で予後が重篤なため注目されている疾患である<sup>14)15)</sup>。その誘因として角膜異物除去後<sup>14)</sup>さらにクロランフェニコールを点眼した場合<sup>15)</sup>およびソフトコンタクトレン

ズ着用<sup>16)</sup>などが重要であることが知られている。感染実験も多く報告され、三井らは緑膿菌をムチンとともに角膜実質内に注入すると重篤な角膜潰瘍を発症することを報告している<sup>15)</sup>。しかし、感染成立の最初の段階である緑膿菌の付着性に関する報告は少ない。

感染の成立には、まず上皮細胞に対する細菌の付着が必要であることは一般的に知られている。角膜に対する緑膿菌の付着性については、Ramphal らは、正常角膜には緑膿菌は付着せず、上皮欠損を伴った外傷を加えることによって付着することを示した<sup>5)</sup>。さらに、Stern らは付着部は露出した実質ではなく上皮に付着することを示し<sup>7)</sup>、時間の経過と共に緑膿菌の侵入を

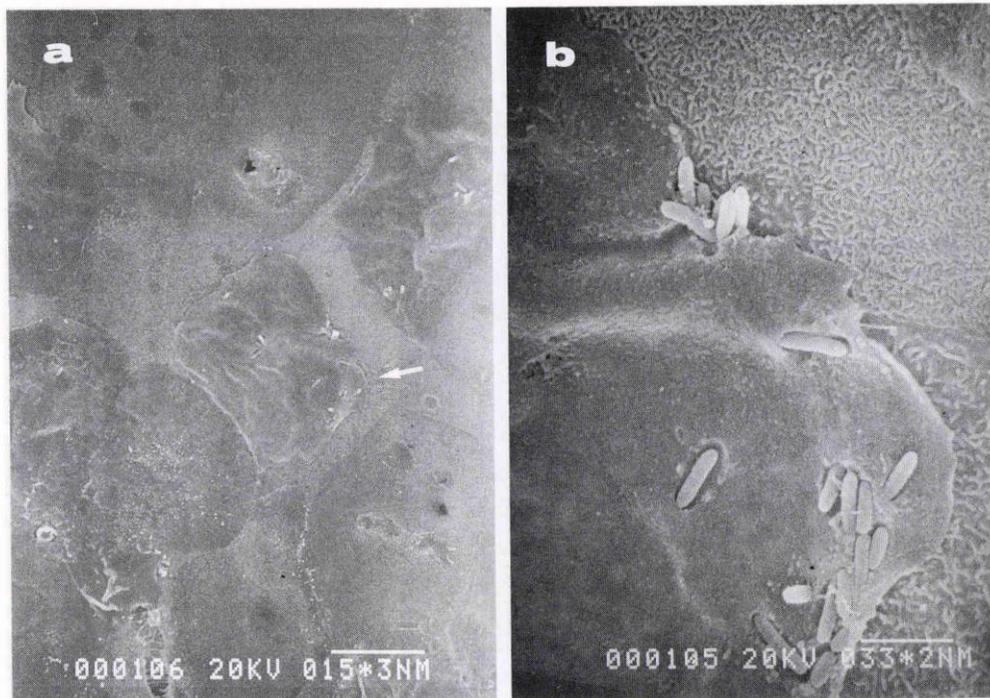


図7 瞬目不能にしたハードコンタクトレンズによる傷害角膜に緑膿菌を点眼し60分後。

- a. 所どころにムチンが張り付くように存在しており、緑膿菌が Pit を形成して存在している。30分後に比べ付着菌数は減少している。(×800)
- b. aの矢印で示した部位の強拡大。ムチンまたはムチンの付着している辺縁に緑膿菌が存在している。(×3,800)

報告している<sup>6)</sup>。また Spurr-Michaud らは *in vitro* で、傷害角膜に緑膿菌は付着し、特に傷害部と上皮再生部の境に多く付着するとしている<sup>8)</sup>。以上の実験は角膜を注射針で傷をつけたり、メスを使って削り取るようにして上皮欠損を作成しているため角膜上皮表層細胞への付着性については殆ど検討がなされていない。

これらの緑膿菌性角膜潰瘍の発症実験は多くは角膜異物除去後と状況がにているが、コンタクトレンズ装用者の発症状況とはかなり異なっていると考えられる。コンタクトレンズ装用によって角膜上皮表層細胞は傷害されることが知られており<sup>16)17)</sup>、その傷害角膜に対して緑膿菌がどのように付着するのか興味深い。

今回の実験では、正常角膜には緑膿菌の付着は認められなかった。これは、瞬目や涙の流れなどの防御作用が知られ、さらに庄可ら<sup>12)</sup>は緑膿菌はムチンからみ取られた形で除去されることを示しており正常角膜では緑膿菌の付着、さらに感染は起こらないという報

告と一致していた。コンタクトレンズによる角膜傷害の程度は、1週間の連続装用を行い Microvilli の減少および消失、細胞膜の変性崩壊、部分的な最表層細胞の剝離、脱落が認められた。これらの所見は、渡部<sup>16)</sup>、河野<sup>17)</sup>らの報告と類似していた。角膜の外傷やコンタクトレンズ装用によってムチンの分泌が増加することが知られている。今回、角膜上に張り付くようにムチンが認められたがグルタルアルデヒドでの固定であるためムチンの全体像を正しく示していないと思われるが分泌の増加を反映していると考えられる。瞬目自由の傷害角膜では緑膿菌の付着はごく僅かであった。これは、傷害により付着が促進されているにもかかわらず、瞬目、涙の流れ、ムチンの浄化作用のほうが勝っていたためと考えられる。

開眼のまま瞬目不能状態にした傷害角膜では多数の緑膿菌の付着が見られた。コンタクトレンズ装用と瞬目不能にすることによりムチンの分泌が増加している

と共に、瞬目不能にすることにより、除去されにくくなり、さらに乾燥することによって角膜上に多くみられるようになった。接種後15分では緑膿菌がムチンにからめ取られたように存在し、瞬目が正常に行われていれば、涙液とともに、このまま除去されるであろうと予測される。30分以降になると、緑膿菌の除去が進み、菌数の減少が見られるが、残った緑膿菌はさらに強く角膜に付着したムチンとともに、膜状ムチンと角膜の表層細胞への侵入像が観察されるようになった。Sternら<sup>6)</sup>は、30分すると pockets を作って侵入をはじめたことを示しており、私の所見と時間は一致していた。緑膿菌の付着については、気道上皮にたいする研究が多く、Marcusら<sup>7)</sup>はムコイド株が非ムコイド株より10~100倍付着しやすいこと、ムコイド株は Extracellular matrix に Microcolony を作って付着することを示し、Ramphal<sup>2)</sup>らは非ムコイド株の付着には繊毛が重要な働きをすることを報告している。また、Vishwanathら<sup>3)</sup>、Ramphalら<sup>4)</sup>は気管、気管支のムチンが緑膿菌の付着部位であると述べている。

角膜前涙液層は3層からなり、その最下層のムコイド層はポリサッカライドからなり、由来は結膜の杯細胞から分泌されるムチンおよび角膜上皮の表面構造の一部から構成されていると考えられている。Wellsら<sup>13)</sup>は、ムコイド層に多くの sialic acid が含まれていることを示し、Hazlettら<sup>9)10)</sup>は角膜では、この sialic acid が緑膿菌のリセプターであることを示した。今回の結果から、角膜に張り付いたムチンが緑膿菌の角膜にたいする付着部位であることが考えられるとともに、角膜表層細胞にたいする緑膿菌の付着の形態が観察された。

コンタクトレンズ装用者に見られる角膜炎の発症のメカニズムは未だ不明の点が多い。今回、試みに緑膿菌の付着した角膜に再度コンタクトレンズの装用を続けると、約1週間で角膜は著しく混濁し、パンヌスが形成されるが、はっきりした潰瘍は作らなかった。コンタクトレンズ装用者に良く見られる角膜浸潤と似ているようではあるが、この実験がコンタクトレンズによる角膜潰瘍の発生状況と同じかどうかは、更に検討を要する。

本研究により瞬目や涙の流れが感染防御に重要であることが再認識されたとともに、角膜の傷害時にはムチンの分泌が増加し、それが緑膿菌の除去に働くと共に、緑膿菌のリセプターとしても働くことが推察された。

本論文の要旨は第93回日本眼科学会学術展示において発表した。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲いただきました大石正夫助教授、岩田和雄教授に深謝致します。

#### 文 献

- 1) **Marcus H, Baker NR**: Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium. *Infect Immun* 47: 723-729, 1985.
- 2) **Ramphal R, Sadoff JC, Pyle M, et al**: Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. *Infect Immun* 44: 38-40, 1984.
- 3) **Vishwanath S, Ramphal R**: Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. *Infect Immun* 45: 197-202, 1984.
- 4) **Ramphal R, Guay C, Pier G**: *Pseudomonas aeruginosa* adhesins for tracheobronchial mucin. *Infect Immun* 55: 600-603, 1987.
- 5) **Ramphal R, McNiece MT, Polack FM**: Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the injured cornea: A step in the pathogenesis of corneal infection. *Ann Ophthalmol* 13: 421-425, 1981.
- 6) **Stern GA, Lubniewski A, Allen C**: The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and the corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 103: 1221-1225, 1985.
- 7) **Stern GA, Weitzenkorn D, Valenti J**: Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the mouse cornea: Epithelial v. stromal adherence. *Arch Ophthalmol* 100: 1956-1958, 1982.
- 8) **Spurr-Michaud SJ, Barza M, Gipson IK**: An organ culture system for study of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and wounded corneas. *Invest Ophthalmol* 29: 379-386, 1988.
- 9) **Hazlett LD, Moon M, Berk RS**: In vivo identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 51: 687-689, 1986.
- 10) **Hazlett LD, Moon MM, Strejc M, et al**: Evidence for N-acetylmannosamine as an ocular receptor for *P. aeruginosa* adherence to scarified cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1978-1985, 1987.
- 11) **北野周作**: Ocular surface—その生理と病態一。日眼会誌 91: 1-26, 1987.
- 12) **庄司 純, 崎元 卓, 北野周作, 他**: ムチンの浄化作用。日眼会誌 92: 2038-2047, 1988.

- 13) Wells PA, Hazlett LD: Complex carbohydrates at the ocular surface of the mouse: An ultrastructural and cytochemical analysis. *Exp Eye Res* 39: 19-35, 1984.
  - 14) 三国政吉, 大石正夫, 周田茂雄, 他: 本邦における緑膿菌性角膜潰瘍の統計的観察. *日眼会誌* 71: 1217-1224, 1967.
  - 15) 三井幸彦: 角膜感染症. *日眼会誌* 79: 1651-1664, 1975.
  - 16) 渡部保男, 中安清夫, 平野 東, 他: コンタクトレンズによる角膜障害—Specular Microscopeおよび走査型電子顕微鏡による観察—. *日コ・レ誌* 24: 238-245, 1982.
  - 17) 河野宗浩, 井上克洋: 酸素透過性ハードコンタクトレンズの家兎角膜に及ぼす影響. *日コ・レ誌* 24: 246-252, 1982.
  - 18) 大石正夫: ソフトコンタクトレンズによる角膜感染症の化学療法. *日コ・レ誌* 25: 68-74, 1983.
-