

## 多核白血球の角膜実質内遊走に対する角膜上皮細胞の影響

中安清夫

防衛医科大学校眼科学教室

## 要約

SDラット角膜に軽微な損傷を与えた後、多核白血球(PMN)の角膜実質内遊走を組織学的に観察した。さらに種々の程度の上皮損傷を与えた角膜片培養上清中のPMNsに対する走化性活性を測定し、どのような条件下の角膜上皮細胞がPMNsの角膜実質内遊走をより強く惹起しているのかを検討した。角膜中央部の上皮細胞を剝離した角膜の組織学的な観察では、PMNsは経時的に上皮細胞の再生先端部と一致して輪部より中央部に徐々に侵入・遊走し、中央部に到達したのは18~24時間目であった。一方、上皮細胞剝離後、上皮の再生を阻止する目的で角膜表面に治療用接着剤を塗布した角膜では、術後24時間目で上皮細胞の存在する輪部から周辺部にかけての実質内には多くのPMNsを観察し得たが、中央部の実質内にはほとんどPMNsは観察されなかった。そしてPMNsが中央部に達するまでには96時間以上を要した。また、(1)正常角膜片、(2)再生過程の上皮細胞を有する角膜片、(3)全ての上皮細胞を剝離した角膜片の各々の培養上清を試料として、Boyden chamberを用いてPMNs走化性活性を測定すると、上記の各培養上清のPMNs走化性活性は(2)>(1)>(3)の順に大きくなっていった。以上の結果より、角膜上皮細胞、特に角膜損傷後の再生過程にある上皮細胞はPMNsに対する化学走化性物質を実質内に放出し、PMNsの角膜実質内遊走を惹起しているものと考えられた。(日眼会誌 94:445-456, 1990)

キーワード：多核白血球，角膜上皮細胞，角膜損傷，走化性活性，ラット

## Interaction Between Corneal Invasion of Polymorphonuclear Leukocytes and Corneal Epithelium

Nakayasu Kiyoo

*Department of Ophthalmology, National Defense Medical College*

## Abstract

The interaction between corneal invasion of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and corneal epithelium was investigated following different types of corneal injury. Histological examination of centrally denuded corneas demonstrated that it took 18~24 hours for PMNs to infiltrate into the center of the denuded stroma, approximately synchronous with the reepithelialization. On the other hand, in the centrally denuded corneas immediately covered by glue to prevent the reepithelialization, the time required for the appearance of PMNs at the central portion of the corneas was more than 96 hours. Chemotactic activities of PMNs in the conditioned media of normal cornea, completely denuded cornea and reepithelializing cornea were examined using a Boyden chamber. The highest chemotactic activity was detected in the conditioned medium of the cornea with reepithelialization. These data suggest the possibility that the corneal epithelium, especially the re-covering epithelium,

別刷請求先：359 所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 中安 清夫

(平成元年7月18日受付，平成元年11月20日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Dept. of Ophthalmol., National Defense Medical College  
3-2 Namiki, Tokorozawa-shi 359, Japan

(Received July 18, 1989 and accepted in revised form November 20, 1989)

stimulates infiltration of the stroma by PMNs. (Acta Soc Ophthalmol Jpn : 445—456, 1990)

**Key words :** Polymorphonuclear leukocyte, Corneal epithelium, Corneal injury, Chemotaxis, Rat

## I 緒 言

角膜が損傷を受けた場合、角膜内に遊走する多核白血球(以下 PMNs)の役割りとして、従来より、変性・壊死に陥った細胞および細胞間物質を融解・貪食し、損傷組織の処理にあたりと考えられてきた。しかし近年、PMNsが種々の protease を産生していることが知られるに及んで、PMNsが角膜潰瘍の発症・増悪に重要な役割りを果たしている可能性が指摘された<sup>1)~4)</sup>。また、PMNs自体またはPMNsが産生放出する因子が角膜上皮細胞の増殖再生を抑制するという報告もある<sup>5)6)</sup>。さらにPMNsは角膜内皮細胞を線維芽細胞様細胞に変化させることも報告されており<sup>7)8)</sup>、PMNsの角膜における作用機序は、従来考えられていたよりも、より多岐にわたっているものと推測される。このように損傷角膜において重要な作用を有するPMNsがどのような機序で角膜内に遊走してくるのかを解明することは臨床における角膜潰瘍の発症機序およびその治療法の開発にも通ずる重要なことと思われる。PMNsの角膜内遊走は、損傷角膜に局在する細胞が、PMNsに対する化学走化性物質を放出することが必要条件と考えられる。事実、今日までPMNsに対する走化性物質とされるいくつかの物質を角膜上皮細胞が産生しているという報告がなされている<sup>9)10)</sup>。しかし *in vivo* において、角膜上皮細胞がどのような条件下でPMNs走化性物質を産生・放出しているのかを詳細に検討した結果は見あたらない。本研究の目的は、*in vivo*での組織学的検索ならびに Boyden chamber を用いた *in vitro*の実験系を通じて、角膜上皮細胞がどのような場合により多くのPMNsに対する走化性物質を放出するのかを検索することである。

## II 対象および方法

いずれの実験も月齢2~2.5カ月の健康なSDラットの角膜を用いた。

### 1. PMNsの角膜中央損傷部への到達時間

ベントパルピタルナトリウムの腹腔内麻酔および塩酸オキシブプロカインの点眼麻酔後、各々のラット角膜中央部に、1-1: Razor blade による約4mmの全層角膜線状切開、1-2:ゼラチン塗布スライドガラスに

て直径約3.5mmの円形上皮細胞剥離、1-3:1-2と同様の上皮細胞剥離後、治療用接着剤(Cyanoacrylate. B. Braun社)塗布、1-4:正常角膜表面に治療用接着剤塗布、の4種類の異った損傷を与えた。その後1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96時間目に、各グループについて3ないし4眼の眼球を摘出し、通常の方法でメサクリレート包埋し、ヘマトキシリンエオジン染色した後、光学顕微鏡を用いてPMNsが角膜中央損傷部へ到達するまでの時間を切片上で観察した。また損傷後角膜実質に遊走した細胞がPMNsであることを確認するために、円形上皮細胞剥離後24時間目の角膜について通常の方法でエポソ包埋し、電子顕微鏡を用いて観察した。

### 2. 角膜損傷24時間後の部位別PMNs数

角膜中央部に、2-1:ゼラチン塗布スライドガラスにて直径約3.5mmの円形上皮細胞剥離、2-2:2-1と同様の上皮細胞剥離後角膜治療用接着剤塗布、2-3:2-1, 2-2と同様の上皮細胞剥離後、剥離した上皮細胞を1ml phosphate buffered saline (PBS) 中でホモジェナイズした懸濁液を上皮細胞剥離角膜上に数滴滴下し、さらに治療用接着剤塗布、2-4:正常角膜表面に治療用接着剤塗布、の4種類の異った角膜損傷を与えた後、24時間目に各グループそれぞれ8~10眼を摘出した。通常の方法で角膜をメサクリレート包埋し、ヘマトキシリンエオジン染色した後、光学顕微鏡を用いて角膜実質中央部、角膜周辺部の一定面積(0.3×0.3mm)および前房側角膜内皮細胞面の一定長さ(0.3mm)あたりに遊走したPMNs数を切片上で測定した。

### 3. PMNsに対する走化性活性の測定

12%滅菌ペプトン液10mlをSDラットの腹腔内に注射し、16時間後、開腹し腹腔内に析出したPMNsを採取した。3-1:直径約5mmの正常角膜片、3-2:中央部に直径約3.5mmの上皮細胞を剥離した角膜片(直径約5mm)、3-3:全ての角膜上皮細胞を剥離した角膜片(直径約5mm)、の3種類の角膜片を作製し、直ちに10%Fetal Calf Serum (FCS) 添加のEagle MEM 1ml 中で各々24時間培養(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)した後、各培養上清中のPMNsに対する走化性活性をBoyden chamber (Newroprobe社)を用いて測定した。すなわち、Boyden chamberの上室には、採取したPMNs

浮遊液 ( $2.7 \times 10^6$ /Eagle MEM 1ml) を、下室には上記の各々の角膜片培養上清1ml を入れた、フィルター (Nuclepore 社) は直径  $2 \mu\text{m}$  の孔を有するものを使用した、Boyden chamber は、incubator ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ) 内に2時間放置した後、上室からフィルターを通過し、下室底のカバーガラス上に達した PMNs をトルイジン青染色し、各検体について無作為に3カ所光学顕微鏡にて写真撮影 ( $\times 40$ ) し、印画紙上の PMNs 数を測定した、又、対照として用いた  $10\% \text{FCS}$  加 Eagle MEM, 及び  $10^{-5} \text{mol}$  N-Formyl-Met-Leu-Phe (N-FMLP)/Hanks BSS (Peninsula Lab.) についても同様の方法で測定した。

### III 結 果

#### 1. PMNs の角膜中央損傷部への到達時間 (表1)

角膜中央部の上皮細胞を円形剝離した後、24時間目の角膜を電子顕微鏡を用いて観察すると、図1に示すように、剝離直下の実質細胞は変性・壊死しており、それに接するように多数の PMNs が確認できた。一方、損傷周辺部の実質を観察すると、正常構造を保った実質細胞に接して、種々の段階のラインゾームを持った細長い細胞も観察されたが、その数は極めて少数であった (図2)。

角膜中央部に全層線状切開を与えた場合 (1-1)、術後6時間で PMNs が損傷部に観察された。それらの PMNs は涙液側から上皮欠損部より侵入し、主に実質前層、損傷部周囲に分布していた (図3)。一方、前房側からは同時期すでにフィブリン塊が、実質欠損部をふさいでいた。このフィブリン塊中にも PMNs が観察されたが、これらの PMNs は主に実質の深層内に侵入していた。中央部を円形に上皮剝離した角膜 (1-2) では、術後18時間までにはほぼ上皮の再生は終了していた。PMNs の損傷部への出現も、ほぼこの時期と一致しており、術後18~24時間目であった (図4)。これらの PMNs は、周辺部から中央部に向かって侵入しており、上皮の再生の先端部と PMNs の侵入先端部とは経時的にはほぼ一致していた。中央部上皮剝離後、治療用接着剤を塗布した角膜 (1-3) の術後24時間目の角膜 (図5, 6) を観察すると、上皮細胞の再生は治療用接着剤によって阻止されており、その先端部は、塗布した治療用接着剤の上方にわずかに伸展するのみであった。この部位の直下実質内には輪部血管由来と考えられる多数の PMNs が集積していたが、それより中央部の接着剤を塗布した上皮細胞欠損部の実質内には

表1 SDラットに4種類の角膜損傷を与えた後、経時的に組織標本を作成し、PMNsが角膜中央損傷部へ到達するまでの時間を切片上で観察した。

実験	時間 (hs.)	備考
1-1: 全層線状切開	6	涙液および前房側から遊走。
1-2: 中央部上皮細胞剝離	18~24	上皮細胞の再生に伴って遊走。
1-3: 中央部上皮細胞剝離後 接着剤塗布	96~	接着剤により、上皮細胞の再生は阻止される。
1-4: 正常角膜に接着剤塗布	~18	接着剤は約12時間までに自然脱落。

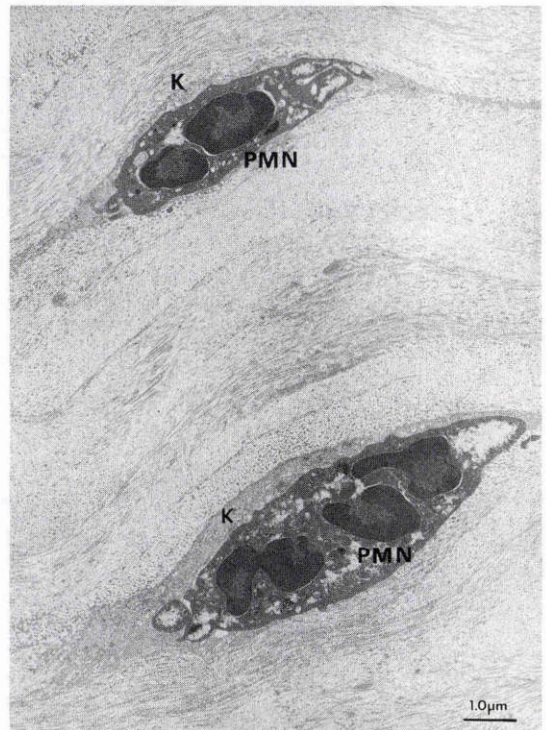


図1 中央部上皮剝離後24時間目の角膜電顕写真。上皮剝離直下の実質前層には変性・壊死した実質細胞 (K) に接して、多数の PMNs が観察される ( $\times 13,500$ )。

PMNs の侵入は観察されなかった。中央部実質前層の実質細胞はほとんど消失しており、又、接着剤と接する実質表面は収縮し、上皮剝離のみの角膜に比べ損傷がより強かったにもかかわらず、PMNs が中央部に達するまでには96時間以上を要した (図7)。一方、正常角膜表面に接着剤を塗布したもの (1-4) では、接着剤によって上皮細胞が損傷されていたが、ほとんど全例で、接着剤は術後12時間までに自然脱落していた。そ

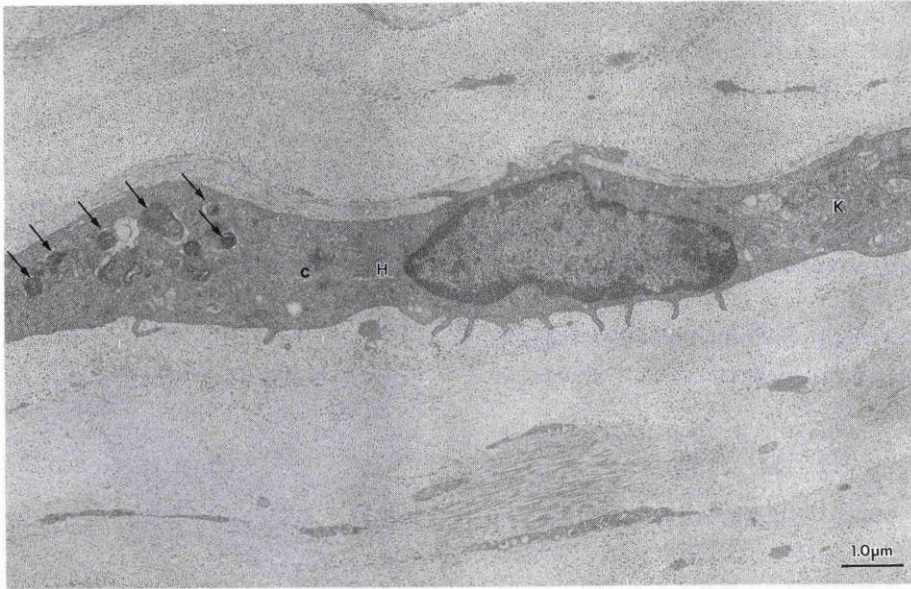


図2 中央部上皮剥離後24時間目の角膜電顕写真。周辺部の実質を観察すると、正常実質細胞(K)に接して、種々の段階のライソゾーム(矢印)、中心子(C)を持つ細長い組織球様の細胞(H)が少数ながら観察される(×15,000)。

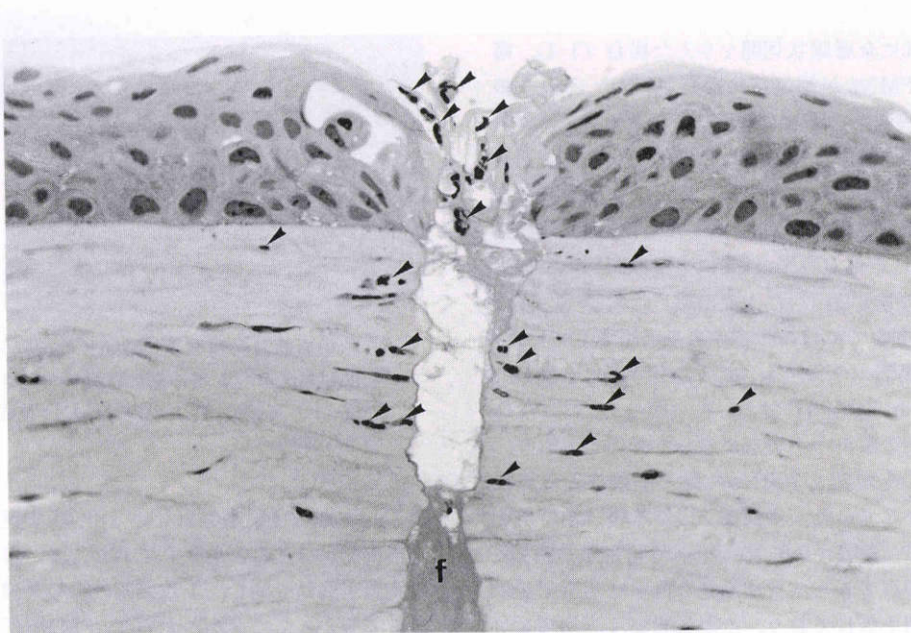


図3 中央部全層線状切開後6時間目の角膜。再生上皮とともに涙液側からPMNs(矢印)が上皮欠損部より実質前層に侵入している。一方前房側からはfibrin塊(f)が実質欠損部を閉鎖している。ヘマトキシリン・エオジン染色(×102)。

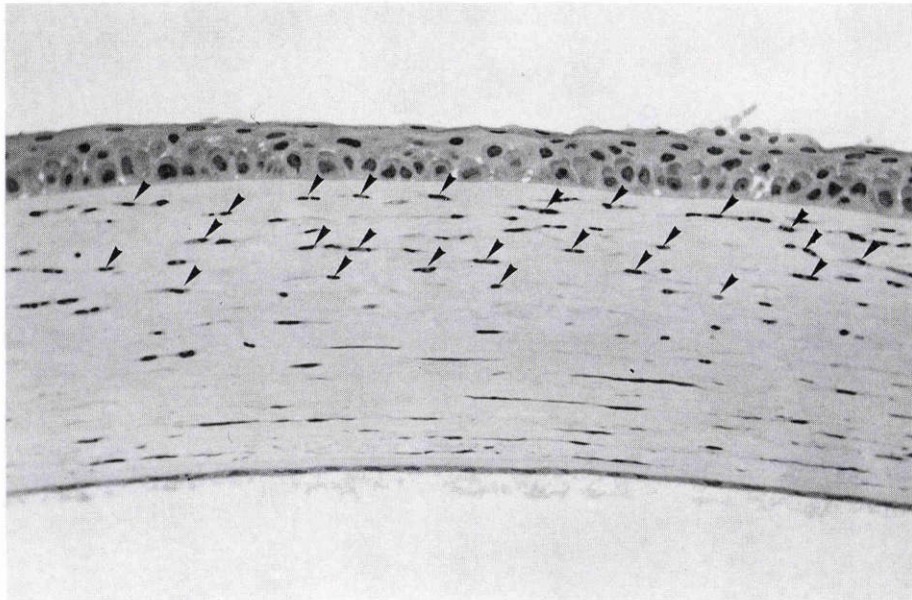


図 4 中央部上皮剥離後24時間目の角膜. すでに上皮細胞再生は修了している. 上皮剥離した中央部実質前層には変性・壊死した実質細胞にかわって多数の PMNs (矢印) が侵入している. ヘマトキシリン・エオジン染色 (×64).

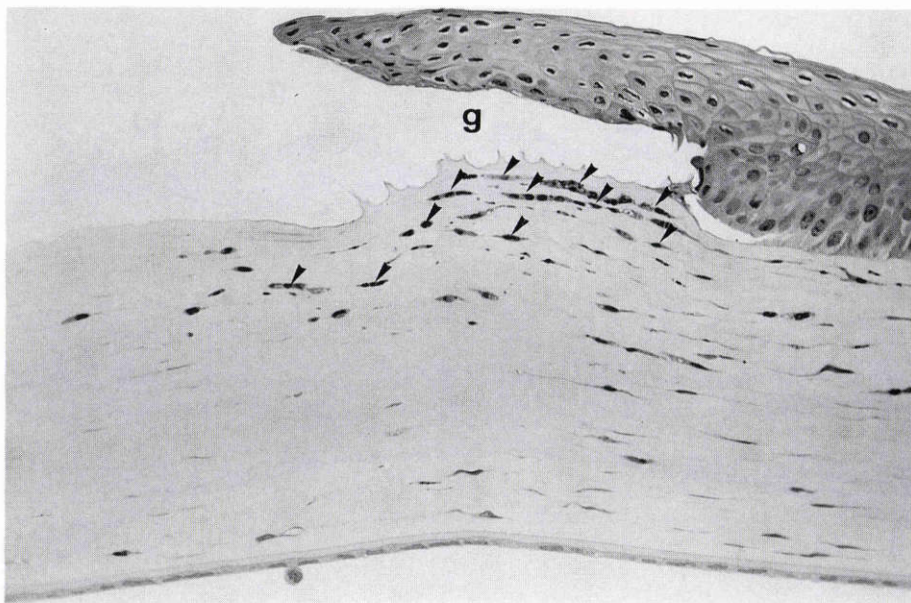


図 5 中央部上皮剥離+治療用接着剤塗布後24時間目の角膜周辺部. 上皮細胞は接着剤塗布部分 (g) の上方にわずかに伸展している. この部位の直下実質内には輪部血管由来の PMNs (矢印) が多数観察される. ヘマトキシリン・エオジン染色 (×64).

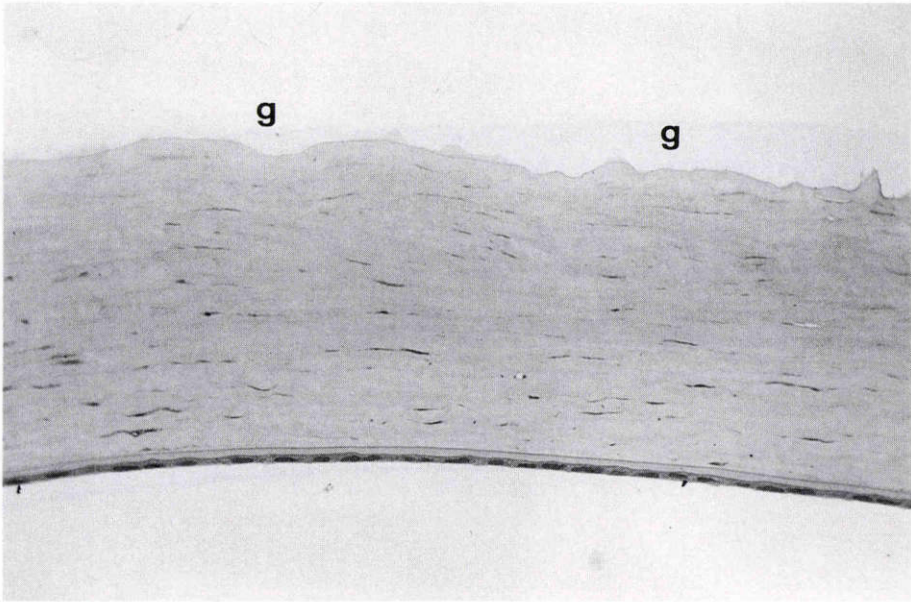


図6 中央部上皮剥離+治療用接着剤塗布後24時間目の角膜中央部. 実質前層の実質細胞は変性・壊死しているにもかかわらずPMNsの侵入は観察されない. ヘマトキシリン・エオジン染色(×64). g: 接着剤塗布部分

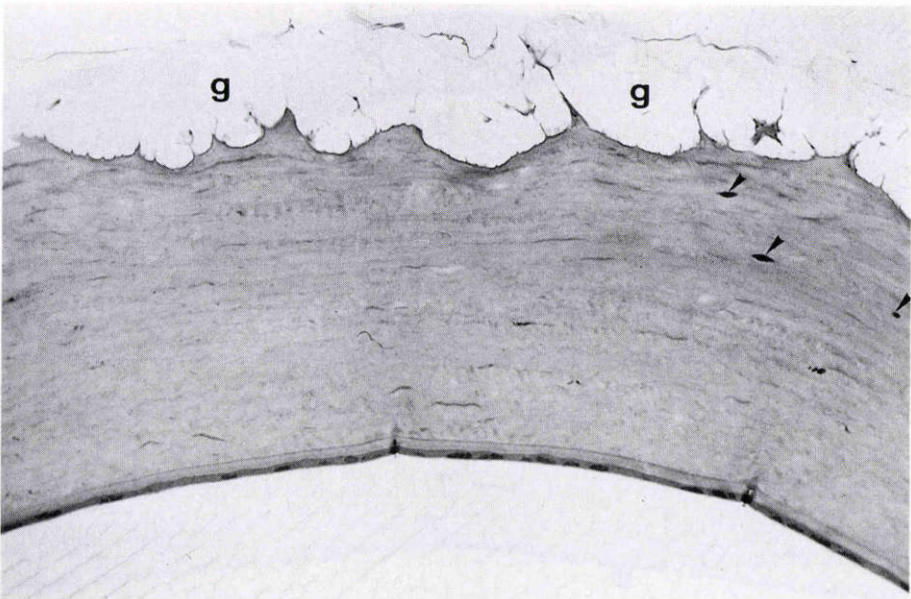


図7 中央部上皮剥離+治療用接着剤塗布後96時間目の角膜中央部. 接着剤塗布部(g)に接した実質表層は収縮し, 前層の実質細胞も変性・壊死し消失している. この時期でもPMNs(矢印)はごく少数しか観察されない. ヘマトキシリン・エオジン染色(×64).

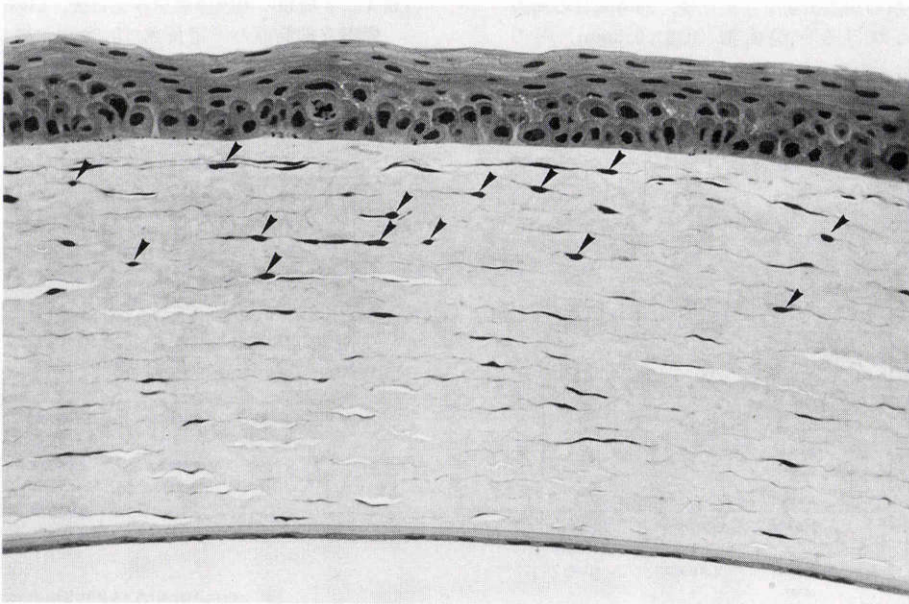


図8 正常角膜上に治療用接着剤塗布後18時間目の角膜。接着剤は12時間目までに自然脱落している。損傷された上皮細胞は、正常の層状構造に再生され、実質前層にはPMNs(矢印)が侵入している。ヘマトキシリン・エオジン染色(×64)。

の後、18時間までに上皮細胞は、ほぼ正常の層状構造に再生されており、この時期(術後18時間)に一致して中央部実質内にPMNsが観察された(図8)。

## 2. 角膜損傷24時間後の部位別 PMNs 数(表2, 3, 4)

異った4種類の角膜損傷を考えた後、24時間目の角膜中央部における一定面積(0.3×0.3mm)内のPMNs数を表2に示した。直径約3.5mmの中央部上皮剝離後24時間目(2-1)のPMNs数は、 $18.6 \pm 15.2$ とばらつきが大きかったものの平均値では、4種類の損傷のうち、最も大きかった。なお、1.で示したように剝離後24時間目では、すでに上皮細胞の再生はほぼ終了していた。一方、剝離直後、上皮細胞の再生を阻止する目的で治療用接着剤を塗布した角膜(2-2)では、角膜実質の損傷が大きかったにもかかわらずPMNsは、 $0.9 \pm 1.5$ と、ほとんど認められず、上皮細胞剝離のもの(2-1)と比較し有意差が認められた( $p < 0.05$ )。中央部上皮細胞剝離後、ただちにその懸濁液を滴下し、治療用接着剤を塗布した角膜(2-3)では、8眼中1眼にのみ18コ/0.3×0.3mmとやや多いものが認められたが、他の7眼は0又は数個のみしか観察されず、2-2と比べ有意差は認められなかった。又、正常角膜表面に治療用接着剤を塗布した角膜(2-4)では、2-2、2-3

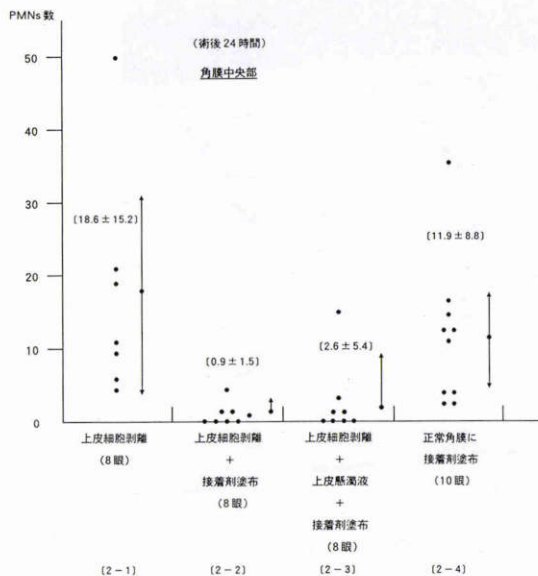
に比べPMNs数は、やや多いように思われたが、統計学的有意差は認められなかった。角膜周辺部について、それぞれの損傷後24時間目のPMNs数/0.3×0.3mmを測定すると(表3)、角膜中央部上皮細胞剝離のみの角膜(2-1)よりも剝離後治療用接着剤を塗布した角膜(2-2)が、さらに(2-2)よりも剝離+上皮懸濁液滴下+治療用接着剤を塗布した角膜(2-3)がより多くのPMNsを観察し得た。Welchの検定では、2-1と2-2の間には有意差は認められなかったが、2-1と2-3との比較では2-3に有意に大きい傾向( $P=0.1$ )が認められた。前房側角膜内皮細胞面の一定長さ(0.3mm)当たりのPMNs数(表4)は、いずれの角膜損傷においても、ごく少数で、損傷の種類による差は認め得なかった。

## 3. PMNs に対する走化性活性(表5, 図9)

各角膜片の培養上清を採取する際、中央部のみの上皮細胞剝離角膜片では、上皮細胞の再生終了直前であること、また全上皮細胞剝離角膜片では、上皮細胞が全く存在しないことを実体顕微鏡を用いて確認した。

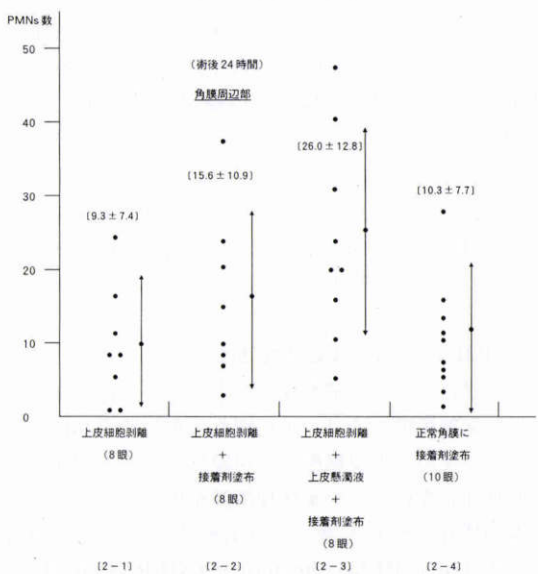
各角膜片の培養上清および対照として用いた10% FCS加Eagle MEM、 $10^{-6}$ mol N-FMLP/Hanks BSSをBoyden chamber下室に注入し下室のカバーガラス上に落下したPMNs数を表5に示した。対照として

表2 4種類の角膜損傷を与えた後、24時間目の角膜中央部における一定面積(0.3×0.3mm)内のPMNs数.



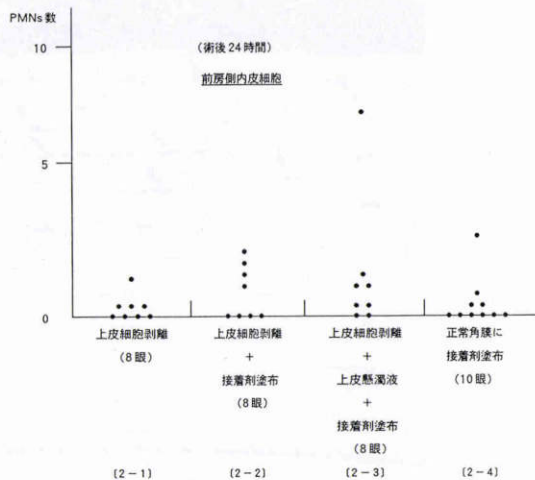
※ 得られた結果について Welch の検定を行なった。  
 ・ 2-1 と 2-2、及び 2-1 と 2-3 の比較では、それぞれ 2-1 が有意に大きかった (P < 0.05)。  
 ・ 2-2、2-3 との比較では、有意差は認められなかった。

表3 4種類の角膜損傷を与えた後、24時間目の角膜周辺部における一定面積(0.3×0.3mm)内のPMNs数.



※ 得られた結果について Welch の検定を行なった。  
 ・ 2-1 と 2-3 との比較では 2-3 が有意に大きかった (P < 0.01)。  
 ・ 2-2 と 2-3 との比較では 2-3 に有意に大きい傾向を認めた (P = 0.1)。

表4 4種類の角膜損傷を与えた後、24時間目の前房側内皮細胞面の一定長さ(0.3mm)当りのPMNs数.



※ いずれの比較においても有意差は認められなかった。

表5 3種類の角膜片培養上清を Boyden chamber 下室に、また PMNs 浮遊液を上室に入れ、2時間放置した後、下室底のカバーガラスを無作為に3カ所写真撮影(×40)し、印画紙上でPMNs数を測定した。Eagle MEM+10%FCSをNegative control, N-FMLPをPositive controlとし同様の測定を行った。

Boyden chamberを用いたPMNs走化性試験  
 (Boyden chamber下室底カバーガラス上のPMNs数)

対象(培養上清)	検体数	PMNs数(平均±標準偏差)
3-1: 正常角膜片培養上清	21	242.9 ± 199.1
3-2: 中央部上皮剥離角膜片培養上清	23	323.1 ± 196.1
3-3: 全上皮剥離角膜片培養上清	20	152.0 ± 58.4
Eagle MEM + 10% FCS	21	43.4 ± 18.4
10 <sup>-8</sup> mol N-FMLP	18	216.7 ± 105.7

得られた結果について Welch の検定を行なった。

- ・ Negative controlとして用いたEagle MEM + 10% FCSに対しては、いずれの対象も有意 (P < 0.01) に大きかった。
- ・ 3-1と3-3、3-2と3-3との比較では、いずれも3-3が有意 (P < 0.01) に小さかった。
- ・ 3-1と3-2の比較では、3-2がやや大きかったが、有意差は認めなかった。

用いた10%FCS加Eagle MEMに対しては、いずれの角膜片培養上清も有意に大きいPMNsを示した (p < 0.01)。対象中、最もPMNs数の多かったものは、中央部のみ上皮細胞を剥離した角膜片の培養上清(3-2)で、そのPMNs数は323.1 ± 196.1であった。以下正常



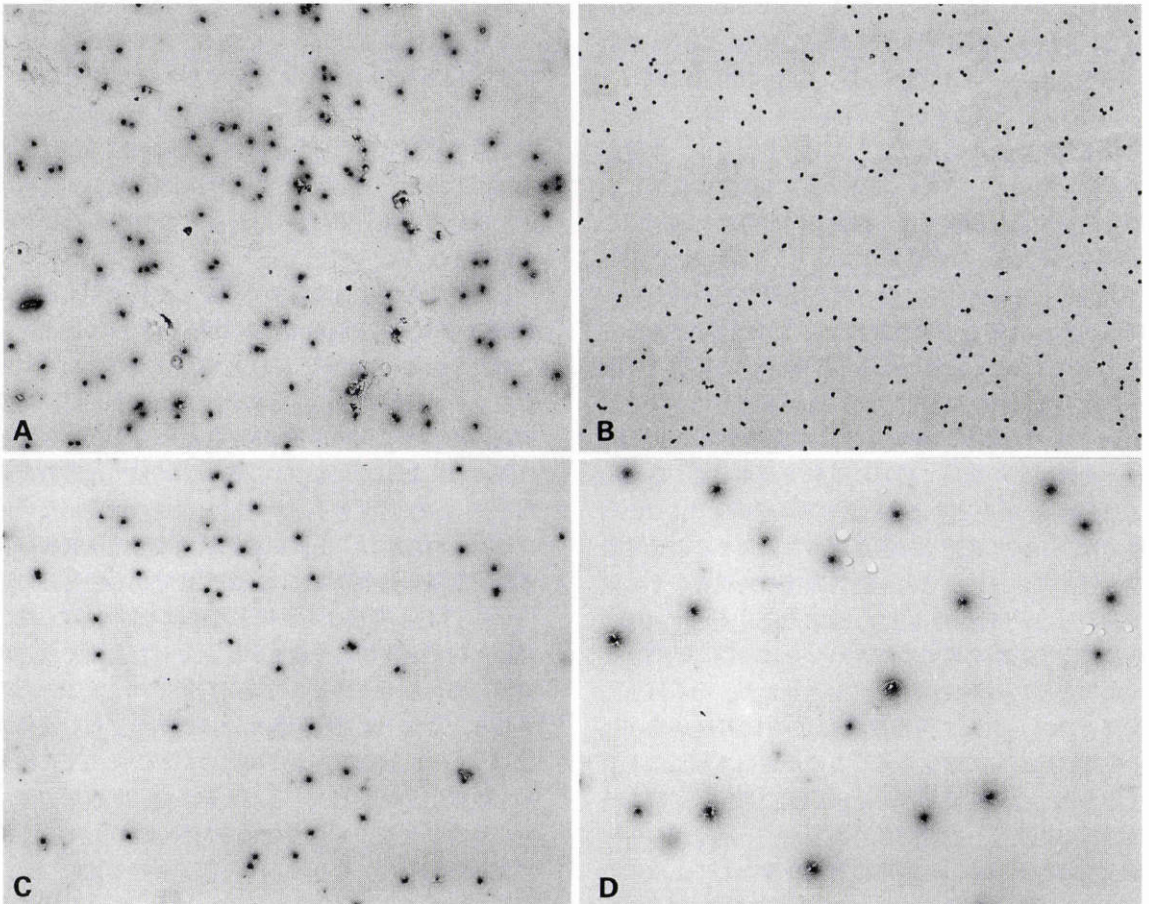


図9 角膜片培養上清のPMNsに対する走化性活性の測定. Boyden chamber 下室底カバーガラスのPMNs, トルイジン青染色 ( $\times 40$ ).  
 A: 正常角膜片培養上清. B: 中央部上皮剥離角膜片培養上清. C: 全上皮剥離角膜片培養上清. D: Eagle MEM+10%FCS

角膜片培養上清 (3-1) が  $242.9 \pm 199.1$ , N-FMLP が  $216.7 \pm 105.7$ , 全上皮細胞剥離角膜片の培養上清 (3-3) が  $152.0 \pm 58.4$  であった. 統計学的には3-3は3-1および3-2に対し, いずれも有意に小さかった ( $p < 0.01$ ). また, 3-1と3-2との比較ではSD値が大きく有意差は認められなかった.

#### IV 考 按

角膜実質内へ遊走するPMNsの起源およびその経路には, 今日まで少なくとも3つの経路の存在が知られている. すなわち, 結膜血管由来で涙液層を介して角膜上皮側から遊走する経路, 虹彩血管から前房水を介し内皮側から遊走する経路および強角膜輪部血管から直接角膜実質内に遊走する経路である. 我々は, す

でこれら3つの経路からPMNsが角膜内に遊走するための条件, 量的・時間的差異について検討した<sup>11)</sup>. 角膜内へのPMNs遊走について考察する場合, 角膜内に侵入してきたPMNsがどこを起源とし, どの経路から遊走したものであるかを常に念頭におく必要がある. 一方, 角膜が損傷を受けた場合, 早期に損傷部に出現する遊走細胞の多くは, PMNsであるとされている. 今回の電子顕微鏡を用いた観察でもそのほとんどがPMNsであると確認できた. しかし少数ではあるが, 損傷周辺部の実質で, 種々の段階のライソゾームを持った組織球様の細胞も観察されている. これらの細胞は角膜実質細胞のように膠原線維間に細長く伸展しており, 電子顕微鏡的には明らかにPMNsと区別されるものの, 光学顕微鏡的には核の染色性がPMNsと

類似しており、PMNs との鑑別は必ずしも十分とは言えない。今回の観察では、光学顕微鏡的に PMNs 類似の細胞であっても、細胞質の長い細胞は極力除外した。しかし、少数ではあるがこの様な細胞が PMNs とされて含まれているであろうことを明記した上で、本研究の考察を進めていきたい。1-1のラット角膜中央部に全層切開を加えた角膜では、術後6時間目に切開周囲の実質内に PMNs が観察されている。これらの PMNs は Robb らの報告<sup>12)</sup>および今回の組織学的観察から、明らかに涙液層を介した経路からの PMNs であると考えられる。また Srinivasan ら<sup>13)</sup>は今回と同様の実験を行なって、術後2時間で PMNs が涙液内に多数出現したと述べており、涙液を介した経路からの PMNs は、角膜損傷後極めて初期の段階で遊走してくるものと思われる。中央部の上皮細胞のみを剝離した1-2の角膜では、上皮基底膜は損傷されることなくその正常構造を保っており<sup>14)</sup>、1-1の全層切開後の角膜のように涙液側からの PMNs の遊走は、通常考えにくい<sup>15)</sup>。1-2の中央部上皮剝離角膜で剝離された上皮細胞は時間とともに周辺部から中央部へと再生されたが、その再生先端部とはほぼ一致して角膜輪部由来の PMNs が徐々に中央部に向かって遊走してくるのが観察された。そして中央部への到達時間は、上皮細胞の再生終了時とはほぼ同様の術後18~24時間目であった。一方、1-3の中央部上皮細胞剝離後、治療用接着剤を塗布して上皮細胞の再生を阻止した角膜では、角膜実質の損傷が1-2の中央部上皮剝離のみの角膜と比べより強かったにもかかわらず、輪部血管からの PMNs が角膜中央部に達するまでに96時間以上も要していた。このことは、輪部血管由来の PMNs が角膜実質内に遊走するためには、実質の損傷よりもむしろ再生しつつある上皮細胞の存在がより強く関与しているのではないかと思わせた。今回使用した接着剤(Cyanoacrylate)は欧米で角膜穿孔などの際に臨床的に用いられているものである<sup>16)~18)</sup>。Kenyon ら<sup>19)</sup>は家兎を用いた実験で、アルカリ薬傷後の角膜にこの接着剤でコンタクトレンズを装着させると、上皮細胞の再生を阻止するとともに、PMNs の実質内浸潤、角膜潰瘍をも予防することができたとし、角膜上皮細胞が PMNs の角膜実質内への遊走に関与しているだろうと述べている。しかし、今一つの可能性として、塗布した接着剤自身に PMNs の遊走阻止作用があることも考えられたため正常角膜に治療用接着剤を塗布した1-4の実験を試みた。残念ながら正常の角膜上に塗布された接着剤は、術後12時間まで

に自然脱落しており、この時点で PMNs の中央部角膜への遊走は観察されなかったため、接着剤自身による PMNs 阻止作用を完全に否定することはできなかった。しかし、接着剤によって損傷された上皮細胞が再び正常の重層構造に再生される術後24時間目には、中央部に PMNs が遊走してきており、1-4においても、上皮細胞の再生と PMNs の遊走との関係が示唆される結果となった。

2の実験の術後24時間目で測定した角膜中央部での PMNs 数は上皮細胞剝離のみの角膜(2-1)に比べ、接着剤塗布を加えた角膜(2-2)に有意に少なくなっていたのは1の実験結果からも当然である。しかし、角膜周辺部における両者の PMNs 数を比較すると有意差は認められなかったものの、その平均値では接着剤塗布角膜(2-2)が大きく、中央部とは逆の結果になっていた。この結果は、上皮細胞剝離角膜と上皮剝離後接着剤を塗布した角膜とでは、輪部血管から血管外に滲出する PMNs 数にはそれほど差はないものの、接着剤によって上皮細胞の再生が阻止された角膜では、角膜周辺部から中央部への遊走が抑制されていると解釈される。また上皮細胞剝離後、接着剤を塗布した角膜(2-2)と上皮剝離後、上皮細胞の懸濁液を滴下し接着剤を塗布した角膜(2-3)との比較では、角膜周辺部で上皮懸濁液を滴下したものに PMNs 数がより多く観察された( $P=1$ )ものの、中央部における比較では、両者の間に有意差は認められなかった。これは、PMNs を角膜中央部まで遊走させるためには上皮細胞懸濁液すなわち、破壊された上皮細胞ではほとんど効果がなく、正常の上皮細胞、さらにいえば細胞増殖などを活発に行なっている再生過程にある上皮細胞の存在がより大きな意味を持つのではないかと考えられた。また2の実験で施行した4つの角膜損傷は、いずれも上皮側のみの損傷であり、虹彩血管由来で前房水を介した PMNs はいずれの損傷においても無視し得るほどのわずかな数であった。

1および2の実験結果から、PMNs の角膜実質内遊走に再生過程にある角膜上皮細胞の関与が示唆されたが、依然として接着剤による直接的あるいは間接的な PMNs 遊走阻止作用の可能性は否定できなかった。そこで Boyden chamber を用いた3の実験を試みた。この実験では、各角膜片作製後直ちに Eagle MEM 内で組織培養し、24時間後に得られた各角膜片の培養上清を試料とした。この時点の各角膜片の上皮細胞の状態は、中央部のみを剝離した角膜(3-2)では上皮細胞の

再生が終了する直前であり、また全ての上皮細胞を剥離した角膜(3-3)では、直径5mmの角膜片内に上皮細胞は全く存在していない状態であった。すなわち、3-1は正常の上皮細胞を、3-2の角膜は再生過程にある上皮細胞を、3-3は上皮細胞を全く含まない角膜片であった。これらの角膜片培養上清は対照として用いた10%FCS加Eagle MEMに対して、Boyden chamber下室底のカバーガラス上のPMNs数は、いずれも有意に大きくなっていった。また、この3つの角膜片培養上清を比較すると、上皮細胞の存在する3-1、3-2が全く上皮細胞の存在していない3-3の角膜片培養上清と比べ有意にPMNs数が大きくなっていった。またPMNsに対する化学走化性物質として知られるN-FMLP( $10^{-6}$  Mol)<sup>20)21)</sup>に対しても、3-1、3-2はその平均値で大きな値を示していた。このことは上皮細胞のない損傷角膜実質片よりも、実質の損傷が軽度でも上皮細胞の存在する角膜片がより強いPMNsに対する走化性活性を示したことになる。さらに、3種類の角膜片培養上清中で、3-2の中央部上皮剥離角膜片の培養上清が最も大きな値を示したことは、再生過程にある上皮細胞がPMNsに対する走化性物質をより多く分泌している可能性を示唆する結果と思われた。

以上3つの実験結果から、角膜上皮細胞、特に剥離後再生過程にある角膜上皮細胞がPMNsに対する化学走化性物質を角膜実質内に放出している可能性が示唆された。角膜上皮細胞がPMNsに対する化学走化性物質を産生分泌しているのではないかという仮説は既に1957年Weimar<sup>22)</sup>によって指摘されている。最近、Srinivasanら<sup>9)</sup>は上皮剥離した角膜の涙液中にプロスタグランジン系物質の活性があったとし、プロスタグランジンなどのアラキドン酸代謝産物がPMNsに対する走化性物質のmediatorとして働いている可能性を示唆している。さらに、Grabnerら<sup>10)</sup>は培養家兎角膜上皮細胞がPMNsに対する化学走化性物質であるcorneal epithelial cell-derived thymocyte-activating factor (CETAF)を産生したと報告している。生体内における角膜上皮細胞は上記の物質を含めた数種類、あるいはそれ以上のPMNsに対する走化性因子を産生分泌することが可能であろう。そしてこれらの物質は、損傷破壊された上皮細胞または実質細胞から放出される量よりも損傷に引き続いて起こる上皮細胞の再生過程で、より大量に放出されているのではないかと考えられた。

本研究の一部は順天堂大学医学部眼科学教室にて行われ

た。稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました中島章名誉教授(順天堂大学)、沖坂重邦教授に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Janoff A, Zeligs J: Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. *Science* 161: 702-704, 1968.
- 2) Brown ST, Weller CA: The pathogenesis and treatment of collagen induced diseases of the cornea. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 74: 375-383, 1970.
- 3) Uitto VJ, Schwartz D, Veis A: Degradation of basement membrane collagen by neutral proteases from human leukocytes. *Eur J Biochem* 105: 409-417, 1980.
- 4) Foster CS, Zelt RP, Mai-Phan T, et al: Immunosuppression and selective inflammatory cell depletion. *Arch Ophthalmol* 100: 1820-1824, 1982.
- 5) Wagoner MD, Kenyon KR, Gipson IK, et al: Polymorphonuclear neutrophils delay corneal epithelial wound healing in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1217-1220, 1984.
- 6) Katakami C, Perkins T, Dorfman N, et al: Polymorphonuclear leukocytes inhibit proliferation of epithelial cells of rabbit cornea. *日眼会誌* 92: 798-805, 1988.
- 7) Irvine AR Jr, Mannagh J, Yuhasz Z: The effect of leukocytic exudates on cultured rabbit corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 65: 60-67, 1968.
- 8) Kay EP, Nimni ME, Smith RE: Modulation of endothelial cell morphology and collagen synthesis by polymorphonuclear leukocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 502-512, 1984.
- 9) Srinivasan BD, Kulkarni PS: The role of arachidonic acid metabolites in the mediation of the polymorphonuclear leukocyte response following corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1087-1093, 1980.
- 10) Grabner G, Luger TA, Luger BM, et al: Biological properties of the thymocyte-Activating factor (CETAF) produced by a rabbit corneal cell line (SIRC). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 589-595, 1983.
- 11) 中安清夫, 高橋明宏: 多核白血球の角膜実質内遊走について. *眼紀* 40: 863-869, 1989.
- 12) Robb RM, Kuwabara T: Corneal wound healing. I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds. *Am J Ophthalmol* 68: 636-642, 1962.

- 13) **Srinivasan BD, Eakins KE**: The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation. *Exp Eye Res* 29: 595—600, 1979.
  - 14) **Nakayasu K**: Stromal changes following removal of epithelium in rat cornea. *Jpn J Ophthalmol* 32: 113—125, 1988.
  - 15) **Basu PK, Minta JO**: Chemotactic migration of leukocytes through corneal layers. An in vitro study. *Canad J Ophthalmol* 11: 235—240, 1976.
  - 16) **Refojo MF, Dohlman CH, Ahmad B, et al**: Evaluation of adhesive for corneal surgery. *Arch Ophthalmol* 80: 645—656, 1968.
  - 17) **Fogle JF, Kenyon KR, Foster CS**: Tissue adhesive arrests stromal melting in the human cornea. *Am J Ophthalmol* 89: 795—802, 1980.
  - 18) **Weiss JL, Williams P, Lindstrom RL, et al**: The use of tissue adhesive in corneal perforations. *Ophthalmology* 90: 610—615, 1983.
  - 19) **Kenyon KR, Berman M, Rose J, et al**: Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glue-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 570—587, 1979.
  - 20) **Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM**: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc Natl Acad Sci* 72: 1059—1062, 1975.
  - 21) **Rowland FN, Donovan MF, Lindsay M, et al**: Demonstration of inflammatory mediator induced inflammation and endothelial cell damage in the anterior segment of the eye. *Am J Pathol* 110: 1—12, 1983.
  - 22) **Weimar V**: Polymorphonuclear invasion of wounded corneas. *J Exp Med* 105: 104—152, 1957.
-