

家兎角膜上皮創傷治癒の生体顕微鏡による観察

林 研

九州大学医学部眼科学教室

要 約

角膜上皮細胞の創傷治癒過程を *in vivo* で観察するために生体顕微鏡を応用した実験を行った。方法は家兎の角膜中央上皮を擦過し、その後の上皮細胞の変化を生体顕微鏡にて観察し、組織学的な所見と比較した。擦過12時間後に上皮欠損部周辺にリチャードソン (R液) に染まらないシート状の部分が現れ、その組織所見をみると1層の再生上皮細胞が同部を覆っていた。24, 36時間後には上皮欠損は縮小したが、角膜表面は粗造であり、組織所見でも1層の扁平な上皮細胞であった。2日後には欠損は消失したが、角膜中央は敷石状の粗造な外観を呈し、組織所見でもまだ1, 2層の再生上皮細胞が覆っていた。3日後には、角膜表面はかなり平滑となり、組織学的所見でも再生上皮細胞は数層になり重層化を示していた。7日後には角膜表面は再生した上皮細胞によってほぼ平滑に戻り、組織でも上皮細胞はほぼ正常な層構造を回復していた。リチャードソン染色後の生体顕微鏡による観察と組織学的検索より、再生上皮細胞の移動から重層化の過程を示す所見を得ることができた。(日眼会誌 95:107-113, 1991)

キーワード：角膜上皮細胞, 創傷治癒, 生体顕微鏡, 重層化

Macroscopic Observations on Corneal Epithelial
Wound Healing in the Rabbit

Ken Hayashi

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

A newly-developed macroscope was applied to observe the healing process of corneal epithelial wound *in vivo*. After removing epithelium of the central cornea, the changes of the corneal surface were observed with the macroscope and the findings were compared with histological examinations. At 12 hours after abrasion, areas unstained with Richardson's staining (R staining) appeared. In the histological section, a single layer of regenerating epithelial cells covered the same area. At 24 and 36 hours after abrasion, the epithelial defects became smaller but surrounding epithelium was rough and showed dot-like staining with R solution. By 2 days, the epithelial defects disappeared. On macroscopic observation, the central corneal surface showed a pavement-like appearance. Histology revealed that the regenerating epithelium still consisted of one or two layers. At 3 days, dot-like stainings were present only in the center and the corneal surface appeared considerably smooth. Histology also showed that regenerating epithelium became columnar and multilayered, thereby suggesting stratification. By 7 days, the abraded corneal surface had recovered its smooth appearance. Histologic

別刷請求先：812 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学部眼科学教室 林 研
(平成2年6月15日受付, 平成2年7月24日改訂受理)

Reprint requests to: Ken Hayashi, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University.

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

(Received June 15, 1990 and accepted in revised form July 24, 1990)

sections also demonstrated that the epithelium had regained its normal structure. Thus, using this microscope, findings suggesting the process of epithelial migration and proliferation could be observed. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95 : 107-113, 1991)

Key words ; Corneal epithelium, Wound healing, Microscope, Stratification

I 緒 言

角膜上皮細胞を機械的に擦過すると、上皮細胞は著しく速く再生する。このような効率的な創傷治癒は、以前より多くの研究者たちの興味を集め、中でも形態学的な変化に関しては様々な報告がある^{1)~6)}。上皮再生を見るための傷害方法としては上皮細胞の機械的擦過が一般的であるが他の方法でも基本的には同様の所見が観察されている。それらの中でも特に重要な点として、角膜上皮細胞の創傷治癒が、再生上皮細胞の伸展・移動から増殖及び重層化という主に二つのサイクルからなっていることが言われている¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾。しかし、これらが時期を異にして起こるのか、同時期に起こるのかについては未だ明確な答えが出されていない。

今回、生体顕微鏡（マクロスコープ）を使用する機会を得た。これは、高倍率の画像をリアルタイムで観察し、ビデオに記録するものである。焦点深度などの関係で組織の表面のみを観察することが可能であるが、角膜上皮などの組織表面の経時的な変化を追うのには最も適している。しかも、今までの形態学的方法に必要な固定、染色などのアーチファクトに影響されることがないことが最も大きな利点である。

今回の実験の目的は、角膜上皮細胞の創傷治癒過程を *in vivo* で観察し、その所見を組織学的な所見と比較・検討することである。再生上皮細胞の移動・増殖という過程を示唆する所見には特に注目した。

II 方 法

実験には New Zealand White 種の雄の家兎、体重 2~3kg のものを用いた。今回用いたマクロスコープは接触型であったため、その接触による上皮細胞への影響を検討するために、家兎を 2 群に分けた。1 群は経時的に上皮細胞の変化を追っていく群と 2 群は各観察時間に屠殺し、観察した右眼と観察しなかった左眼を組織学的な検索に供するものである。以上の方法で、各時間で計 3 眼をマクロスコープで観察し、さらに計 2 眼の組織標本を得た。特に重要と思われる時間帯は実験を再施行して所見を確認した。

白色家兎にケタラール (ketamine hydrochloride) 50mg/kg を筋注し鎮静させた後、固定器に固定してペンタバルビタール (sodium pentobarbital) 50mg/kg を耳静脈より静注した。ペノキシール (0.5%oxyproparacaine) を点眼して局所麻酔した後、手術用顕微鏡下で、中央角膜上皮細胞に 7mm 径のトレビンでマークした。そして、ビーバー-15番 (グリスハーバー社) の刃で、マーク内の上皮を擦察・除去した。その際、角膜実質に傷害を与えないことに最も注意した。

擦過後、12, 24, 36時間後、2日、3日、7日後に角膜上皮細胞を日本光電社製ビデオマクロスコープ IVX 1100を用いて観察した。そのマクロスコープは、カメラのプロープと本体からなっている。プロープには CCD カメラとライトガイドおよびレンズが組込まれており、本体には CCD カメラのコントロールユニットと光源が内蔵されている。本体はビデオモニターおよびカメラに接続されており、プロープで得られた画像は本体を通して、ビデオモニターに現れ、さらにビデオレコーダーに記録される。レンズは 25倍から 1,000倍までの各倍率のレンズが備わっており、レンズの変換により高倍率の像が観察可能である。今回の実験には 200倍のレンズを用いた。

観察にあたっては、上皮欠損部をリチャードソン染色液 (methylene blue-Azure II) (R 液) にて染色した。液は、使用するたびに 2% methylene blue と 2% Azure II を同量で混合し、ろ過して使用した。この染色液は上皮欠損部を青色に染めるとともに病的細胞など膜構造が完全でない細胞に取り込まれて染色する。リチャードソン染色液は、フルオレセインなどに比べ強く組織を染色することが重要な特徴である。今回の実験では、1, 2 滴を滴下して、約 30 秒待った後、15 ml の BSS で洗浄し、マクロスコープで観察した。

マクロスコープによる観察後、ただちに固定液 (4% glutaraldehyde-0.1 M cacodylate buffer) を角膜表面に滴下して約 1 分待った。その後直ちに両眼球を摘出した。さらにツベルクリン注射針を用い、約 0.2cc の固定液を角膜輪部より前房内に注入した。摘出した眼球は固定液中に入れ浸漬固定した。家兎は空気を心臓

内に注入して屠殺した。摘出した眼球は約1~2時間の固定後、角膜を約0.5mmの強膜片と共に切除して、角膜中央部を通るように半割した。半割した試料はさらに約1週間の固定後、従来の方法によって、3 μ 厚のパラフィン切片として、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。標本は光学顕微鏡下で観察し写真を撮った。また記録したビデオ画像は、ビデオの画像信号をカラービデオプリンター(ソニー社)により写真にプリントした。

III 結 果

今回使用したマクロスコープのプロープが接触型であり、接触によるアーチファクトを考慮するために、前述したように実験に使用した家兎を2群に分けた。1群は経時的に観察していく群、2群は各時間の観察後に屠殺し、組織学的な検索を行なう群である。それによると、やはり実際にはプロープの接触により、再生先端部の上皮は軽度の傷害を受けているようで、著しい場合には上皮が一部剝離していた。そのため、今回の報告には、最も接触の影響が少ない2群の家兎の記録を用いた。

1. マクロスコープによる観察

正常な角膜表面はR液に全く染まらず平滑であった(図1A)。

擦過直後には、上皮欠損部がR液に強く染まり、正常な上皮細胞と明確に区別されていた。また欠損部の周辺の上皮細胞は浮腫状を呈しており、軽度に膨隆していた(図1B)。

擦過12時間後には、以前擦過した部分の辺縁にシート状にR液に染まらない部分が現れた。この部は、擦過しなかった部の上皮細胞と明らかに区画されており、再生上皮細胞と考えられた(図1C)。

擦過24時間後には、肉眼的にも上皮欠損部は縮小したが、マクロスコープによる観察でもR液に染まらない再生上皮細胞と考えられる部分が伸展していた。さらに擦過していない正常上皮細胞との境界も不明瞭となった。

擦過36時間後には、上皮欠損は角膜中央に小さく認められるのみとなったが、周囲の再生上皮細胞は点状及び線状にR液に染まって粗造であった(図1D)。

擦過2日後には、上皮欠損は消失したが、角膜中央部は数石状の粗造な外観を呈し、凹凸が認められた(図1E)。

擦過3日後になると、角膜中央の一部に点状にR液

の染色がみられるのみとなり、角膜表面はかなり平滑となった(図1F)。

擦過7日後には、擦過した角膜表面は、再生上皮細胞によって平滑となり、擦過前の正常な角膜表面とほぼ同様の外観を呈していた(図1G)。

2. 組織学的検索

正常な角膜は、基底細胞、中間細胞、翼状細胞などの5~6層の上皮細胞から構成されていた(図2A)。

擦過直後には、擦過した部の上皮は完全に除去されており、実質への傷害も認められなかった。

擦過12時間後には、一層の扁平な再生上皮細胞が、欠損部を被覆し始めていた。また擦過した部の実質1/3から1/2層の角膜実質細胞は変性もしくは消失していた。さらにその周囲の実質細胞も線維芽細胞様に変化していた(図2B)。

擦過24時間後には、同様に扁平な再生上皮細胞が更に伸びて欠損部は縮小していた。再生上皮細胞は実質細胞の変化・消化した部分上を被覆していた。

擦過36時間後には、上皮欠損部はかなり小さくなり、再生上皮細胞がほぼ全体を被覆していた。この上皮は依然一層の扁平な上皮からなっていた。再生上皮下の実質では、実質細胞は消失していた(図2C)。

擦過2日後の再生上皮細胞は、依然一層であるものの、やや丈が高く立方状となっていた。核は、細胞下方に位置していた。さらに翼状細胞も所々に認められた(図2D)。

擦過3日後に至ると基底細胞に加え、翼状細胞が角膜表層をほぼ覆うようになっていた。さらに一部に中間細胞も見られるようになり全体に重層化していることが認められた(図2E)。

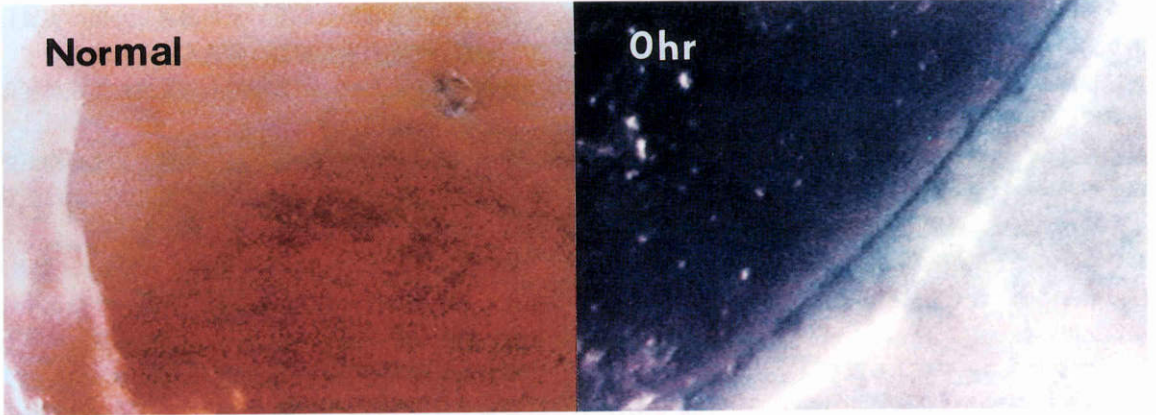
擦過7日後には、5~6層の上皮が全体を被覆しており、正常上皮細胞の層構造を回復していた(図2F)。

IV 考 按

今回、マクロスコープを応用して、角膜上皮細胞の創傷治癒の経時的変化を今まで得られなかった高倍率で観察することが出来た。角膜上皮細胞の再生に関しては、今まで多くの形態学的な研究がある。特に電顕を用いた研究は多くの詳細な情報を与えた。しかし、形態学的な研究は、固定・包埋などの過程を経る必要があるが、マクロスコープによる検索にはこのような処置によるアーチファクトが全く関係しない。そのため、実際にin vivoで起きている変化を観察することができると考えられる。

今回使用したレンズは200倍の倍率であり、細胞レベルの所見は得ることができなかった。しかし、組織学的な検索と対比することにより、重要な情報を示唆する所見を得た。すなわち、擦過12時間後から、上皮欠損部周辺にシート状の細胞層が徐々に伸びてゆくのが観察された。組織学的にみると、一層の扁平な上皮細胞であり、再生上皮細胞が移動している所見と考えられた。24, 36時間と経るにつれ、肉眼的にも上皮欠損部は縮小した。しかし、マクロスコープによる観察では、その周囲の上皮細胞も点状に染まり粗造であった。

組織でもほぼ扁平な一層の上皮であり、上皮欠損が閉鎖するまで、上皮細胞の再生は細胞の移動が主であると考えられた。マクロスコープ所見におけるR液の染色に関しては、R液は主に病的な細胞に取り込まれるとされているが、細胞の膜構造が十分でない場合に取り込まれると考えられる。そこで、ここでのR液の染色はむしろ再生過程での未熟な細胞に取り込まれたと推察される。2日後に至ると肉眼的には上皮欠損は消失したが、マクロスコープで見ると角膜中央が敷石状の外観を呈して凹凸不整となっており、R液が陥凹の

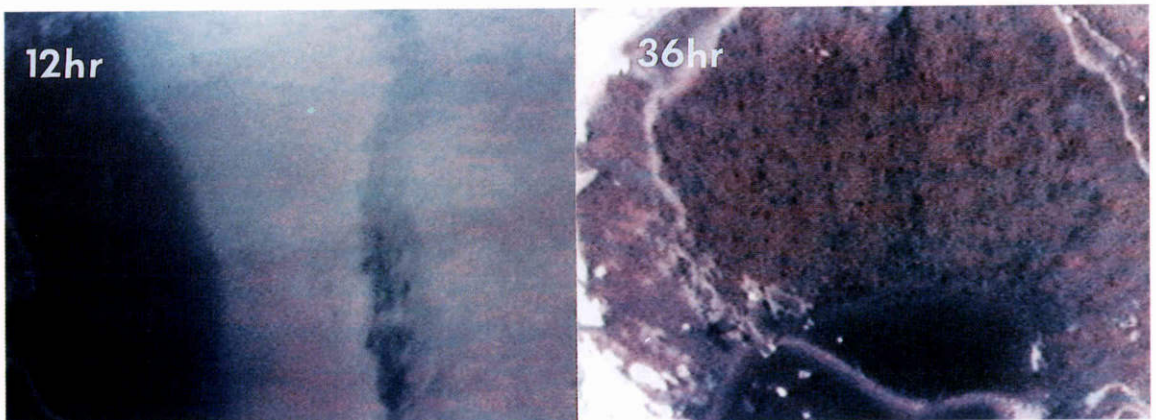


A

B

A：正常角膜；角膜表面は平滑であり、一部に陥凹が認められる。

B：上皮擦過直後；上皮欠損部は、リチャードソン液（R液）に青色に染っている。欠損部周囲の上皮は、ごく軽度浮腫状に隆起している。

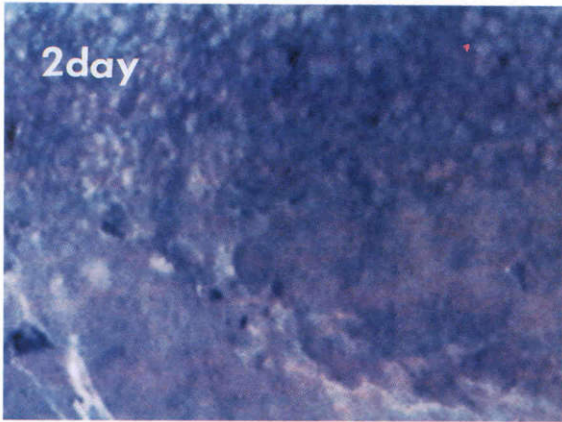


C

D

C：擦過12時間後；欠損部周辺にR液に染らない再生上皮細胞が現れた。

D：擦過36時間後；上皮欠損は縮小し、図の下方のように中央角膜に小さく認められるのみとなった。その周囲の再生上皮細胞も、点状線状にR液に染り、粗造である。



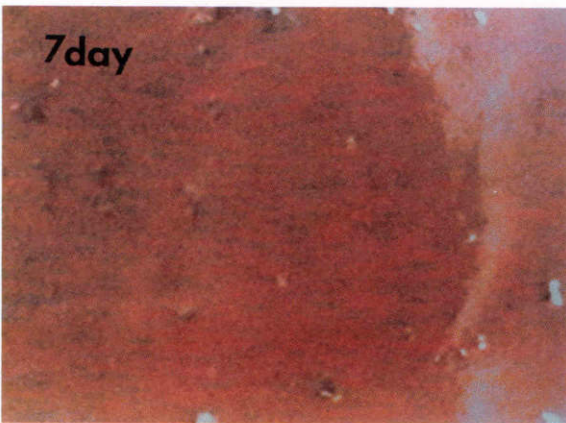
E

E: 擦過2日後: 図上方の再生上皮部は敷石状の外観を呈して, 陥凹部にR液が貯留している。



F

F: 擦過3日後: 角膜中央は, 点状にR液に染色される部分が残されているが, 全体にはほぼ平滑となっている。



G

G: 擦過7日後: 角膜表面は, 平滑になっている。正常角膜に比べると, 陥凹がやや多い。

図1 角膜上皮創傷治癒のマクロスコープによる観察所見 (×200)

ように明らかに重層化していることが双方の所見から示された。7日後には, 角膜表面は正常と同じように平滑となり, 組織でも上皮細胞が正常の層構造を回復しているのが認められた。このように, マクロスコープ所見の解釈はまだ完全には確立されていないが, マクロスコープによる実際の *in vivo* の所見と組織学的な所見の間におおよそその一致を見た。

このように, 今回の実験はマクロスコープで得られた実際の所見と, さらに組織学的な検索を対比しながら進めて行った。先に述べたように, 最も重要な点は, 経時的に上皮細胞の創傷治癒を追っていくと, 欠損部が閉鎖するまではほぼ1, 2層の扁平な再生上皮細胞の移動が主であり, その後徐々に細胞の重層化が起こることが示されたことである。擦過した創の大きさにもよると考えられるが, 今回の実験では, 径7mmで上皮細胞を擦過しており, 臨的に見る上皮欠損としても決して小さくなく, 細胞移動による創閉鎖が早かったことは興味ある所見である。数多くの研究が, 上皮細胞の移動もしくは増殖それぞれについて詳細な報告をしているが, これらが起こる時期の違いについて焦点をあてた報告は少ない。Pfisterも, 電顕を用いた検索で, 上皮欠損が閉鎖するまでは, 2, 3層の上皮細胞の移動が早くおこると報告している⁷⁾。しかし, 今回の実験で観察された細胞の移動が重層化に比べて早く起こるということが, 普遍的な上皮細胞の創傷治癒過程であるかどうか結論を出すには更に多方面からの

部分に貯留していた。組織でも再生上皮細胞の丈が高く立方状となっており, 所々に翼状細胞も見られた。マクロスコープで見られた敷石状の外観が, 再生基底細胞の立方化及び一部重層化の始まりと解釈できるかも知れない。3日後に至ると角膜中央の一部にR液の点状の染色がみられるのみとなり, 全体の角膜表面はかなり平滑となった。組織でも基底細胞層に加え, 翼状細胞及び中間細胞も認められるようになった。この

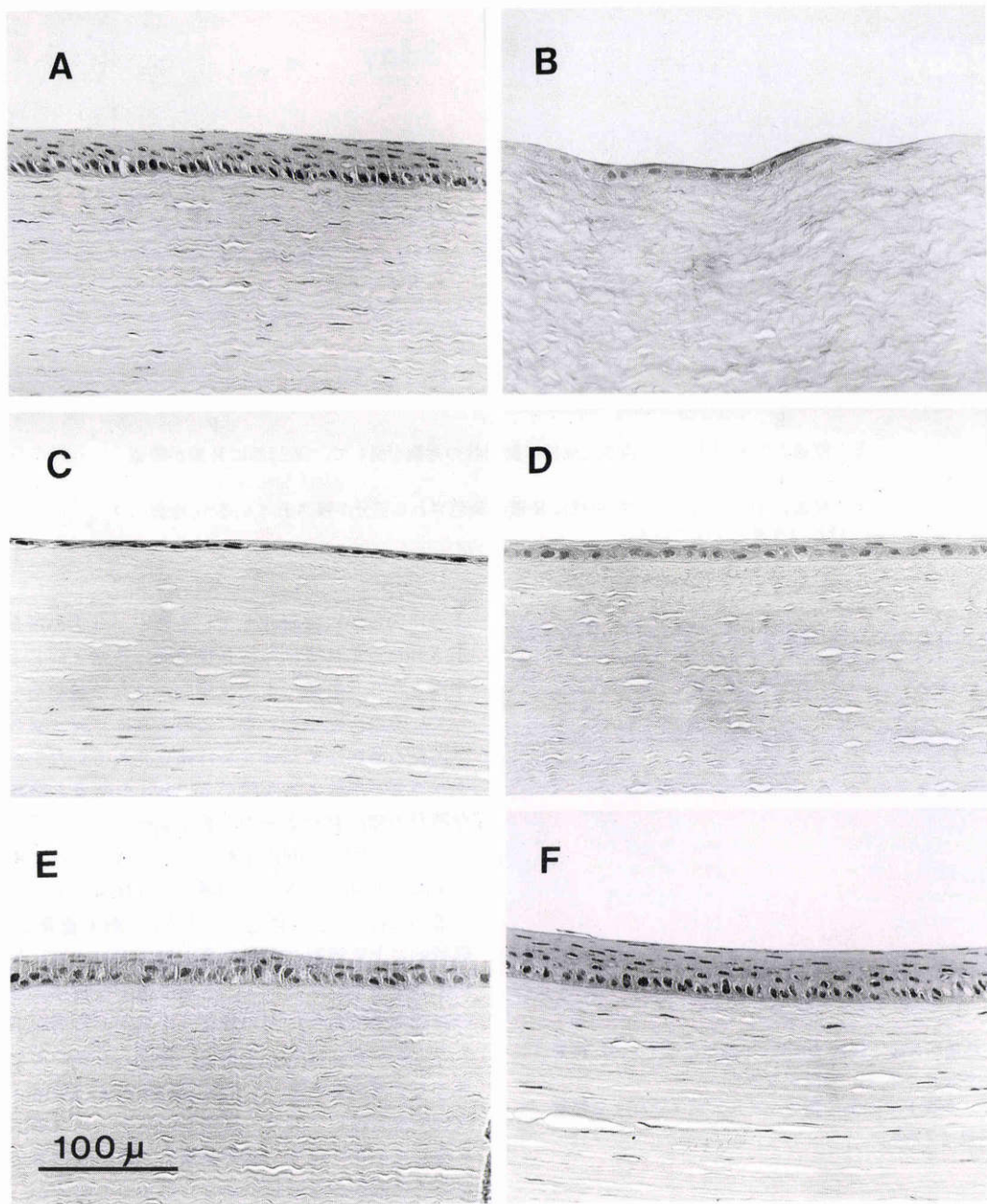


図2 角膜上皮再生の光学顕微鏡による観察所見 (×230)

A: 正常角膜; 5, 6層の上皮細胞が, 層構造をなしている. B: 上皮擦過12時間後; 1層の扁平な再生上皮細胞が擦過部を被覆しはじめている. C: 擦過36時間後; 擦過した部をおおう上皮細胞は, ほぼ1層の扁平な上皮細胞からなっている. D: 擦過2日後; 擦過した部は, まだほぼ1層であるが, 細胞はやや立方状になっている. 一部に翼状細胞も出現している. E: 擦過3日後; 基底細胞と翼状細胞に加え, 一部に中間細胞も見られ, 重層化を示している. F: 擦過7日後; ほぼ正常な層構造を回復している.

研究が必要であろう。また臨床的な面においても、フルオレセインで染色して上皮欠損が消失した場合にも、上皮細胞の層構造が回復したわけではないことには十分気を付ける必要があることが示唆された。

角膜上皮細胞の実際の状態を観察する方法として、臨床的に細隙灯顕微鏡による検索が最も一般的に有用であることには異論がない。しかし、現在、さらに高倍率で細隙灯顕微鏡以上に詳細な所見を得るために、新しい機械が考案・開発されている。共焦点顕微鏡や、本邦で盛んに研究されている上皮細胞のスペキュラーマイクروسコープなどが知られている。特に後者は上皮細胞の細胞レベルの新しい評価方法として確立されつつあり、様々な研究が行われている^{8)~10)}。組織学的な検索と比べながら、角膜上皮細胞の病的な状態や創傷治癒における異常細胞の出現をとらえた報告がある⁹⁾¹⁰⁾。しかし、これらの所見の解釈については、まだ確立されたとはいえない面がある。今回のマクロスコープについても、スリットランプより高率の像が得られることは明らかであるが、まだ所見の解釈が完全ではないし、細胞を見るにはさらに何らかの工夫が必要である。しかし、スペキュラーマイクروسコープが細胞の大きさ・形のみをとらえているのに対し、このマクロスコープは組織の実際の動的な像を見ることができ、例えば血管内の血流の状態などは、マクロスコープで観察できる。このように、組織の動的な面を検索したり、様々な組織に応用可能である点などスペキュラーマイクروسコープに劣らず将来のひろがり期待できる。しかし角膜上皮細胞に関していえば両者の所見を対比しながら、新しい知見を得る方向に進む方が妥当であると考えられる。

今回用いたマクロスコープはプローブが接触型であり、やはり接触による軽度の影響が認められた。報告した所見は接触による傷害を除外したものであるが、将来的には非接触型の焦点深度の深いものが必要となろう。焦点深度が深くなると角膜を通し、虹彩や水晶

体も観察可能である。又レンズは200倍を用いたが、500倍や1,000倍のレンズを用いることによりさらに詳細な所見を見ることができ、機械は現在改良中であり、近い将来さらに興味ある実験が可能となると考える。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会において報告した。猪俣 孟教授の御校閲に対し深謝致します。

文 献

- 1) **Friedenwald JS, Buschke W**: Some factors concerned in the mitotic and wound healing activities of the corneal epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc* 42: 371-383, 1944.
- 2) **Busejke W**: Morphologic changes in cells of corneal epithelium in wound healing. *Arch Ophthalmol* 41: 306-310, 1949.
- 3) **Matsuda H, Smelser GK**: Electron microscopy of corneal wound healing. *Exp Eye Res* 16: 427-442, 1973.
- 4) **Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG**: Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol* 15: 4-14, 1976.
- 5) **Gipson IK, Anderson AA**: Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 161-166, 1979.
- 6) **Pfister RR**: The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit, a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol* 14: 648-661, 1975.
- 7) **Crosson CE, Beuerman RW, Klyce SD**: Epithelial wound closure in the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 464-473, 1986.
- 8) **Tsubota K**: A contact lens for specular microscopic observation. *Am J Ophthalmol* 106: 627-628, 1988.
- 9) **山田昌和, 坪田一男**: 高含水率ソフトコンタクトレンズ連続装用の角膜上皮への影響—スペキュラーマイクروسコープによる検討—. *あたらしい眼科* 6: 1699-1704, 1989.
- 10) **坪田一男**: スペキュラーマイクروسコープ撮影における画像解析. *あたらしい眼科* 6: 1489-1495, 1989.