

ラット角膜における縫合糸の影響

茂 沢 克 己

東京医科大学眼科学教室

要 約

ラット角膜に各種の糸を縫合し糸に対する浸潤細胞を免疫組織学的に検討した。すべての縫合糸に対してヘルパー/インデューサーTリンパ球、細胞障害性/サプレッサーTリンパ球、Ia抗原陽性細胞の浸潤が認められた。浸潤細胞ではIa抗原陽性細胞が初期から長期にわたって実質内に最も顕著に観察された。ヘルパー/インデューサーTリンパ球の浸潤は細胞障害性/サプレッサーTリンパ球の浸潤より常に多かった。糸の種類別による浸潤細胞の状態は9-0絹糸が10-0ナイロン糸、10-0プロリン糸より強い浸潤を示した。10-0ナイロン糸と10-0プロリン糸では著しい差は認められなかった。抜糸により浸潤細胞は著明に減少した。結紮縫合では糸を層間に留置したものより強い浸潤が認められた。以上の結果より縫合糸は種々の免疫に関与する細胞を浸潤させ、機械的刺激がその反応を強めるものと考えられた。(日眼会誌 95:841-849, 1991)

キーワード：ラット角膜，縫合糸，Ia抗原陽性細胞，Tリンパ球サブセット，免疫酵素抗体法

Effects of Sutures on Rat Corneas

Katsumi Mozawa

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College

Abstract

Cellular infiltration of the suture line was studied immunohistologically after rat corneas were sutured with various types of suture materials. The suture line was invaded by helper/inducer T lymphocytes, cytotoxic/suppressor T lymphocytes, and Ia-antigen-positive cells. Among the invading cells, Ia-antigen-positive cells were the most prominent over an extended period of time from immediately after suture placement. The helper/inducer T lymphocytes consisted predominantly of cytotoxic/suppressor T lymphocytes. The 9-0 silk suture produced a higher degree of cellular infiltration than the 10-0 nylon suture or the 10-0 prolene suture. There was no marked difference in the infiltration produced by the 10-0 nylon and 10-0 prolene sutures. After the sutures were removed, the cellular infiltration appreciably decreased. More marked invasion occurred with interrupted sutures than after the inter-lamellar insertion of suture material. These findings indicate that suture materials on the cornea promote infiltration of immunocomponent cells and that mechanical stimulation of the suture notch enhances such cellular response, which may be involved in graft rejection of the corneal transplantation. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 841-849, 1991)

Key words : Rat corneas, Sutures, Ia-antigen-positive cells, T lymphocyte-subsets, ELISA

別刷請求先：160 新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学眼科学教室 茂沢 克己
(平成2年12月14日受付，平成3年2月6日改訂受理)

Reprint requests to: Katsumi Mozawa, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College.
(Received December 14, 1990 and accepted in revised form February 6, 1991)

I 緒 言

近年、角膜移植は器具や技術の進歩に伴い、透明治癒率も著しく向上している。しかし術後、重篤な合併症である拒絶反応により移植片が混濁する場合もある。角膜移植後の拒絶反応についてはTリンパ球を主体とする細胞性免疫の関与が大きいとされているが今だ不明な点も多い。

これまで著者らはラットの角膜表層移植モデルを作製し浸潤細胞を免疫組織学的に検討した結果、縫合糸周囲にTリンパ球、Ia抗原陽性細胞が多く認められ、縫合糸が角膜移植における免疫担当細胞の出現に何らかの影響を与えていると考えられた。

そこで今回ラット角膜の縫合糸に対する影響を検討するために、3種類の縫合糸を角膜に結紮縫合し免疫酵素抗体法にて糸周囲の浸潤細胞を同定し浸潤の程度を比較検討した。また、縫合糸を角膜実質層間に埋没し、結紮縫合した場合と比較した。さらに抜糸後の浸潤細胞の動態についても検討し若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

8~12週齢の雄ウィスターラット(体重200~250g)を使用した。麻酔はpentobarbital(ネプタール®) 0.3mlの腹腔内注入による全身麻酔を行った。

2. 試料の作製

縫合糸は10-0ナイロン糸、10-0プロリン糸、9-0絹糸の3種類を用いて以下のような実験を行った後、経時的に眼球摘出し試料とした。

1) 結紮縫合群:角膜中央部に約3mmカミソリ刃にて半層切開した後、2針結紮縫合し、術後1日、3日、1週、2週、4週、6週の試料を作製した。

2) 層間挿入群:1)と同様に縫合糸を層間に通して実質内に完全に埋没するよう両端を切断し、糸を2本平行に層間に留置した。術後1週、4週、6週の試料を作製した。

3) 抜糸群:1)の処置後2週の時点で抜糸を行い、6週の試料を検討した。

4) 対照:角膜半層切開後通糸のみを行った眼球。各試料はそれぞれ5眼ずつ作製し、術後処置として1週間(テラマイシン®)の点眼を行った。

3. 免疫酵素抗体法

眼球は摘出後、直ちに(O.C.T. コンパウンド®)に

表1 陽性細胞の強度分類

陽性細胞数	強度
0	—
1~2	±
3~5	+
6~10	++
11~20	+++
21~	++++

凍結包埋し、-80℃に保存した。クライオスタットにて約6μmの凍結切片をつくり、スライドグラスにのせ、アセトン固定後、室温、湿潤箱内で免疫酵素抗体法(ABC法)を行った。抗ラットモノクローナル抗体は、Sera-Lab社製(イギリス)、W3/13(Tリンパ球、好中球)、W3/25(ヘルパー/インデューサーTリンパ球)、OX8(細胞障害性/サプレッサーTリンパ球)、OX6(Ia抗原陽性細胞)を使用した。

4. 観察

1眼につき1切片で角膜中央部の縫合糸周囲を光顕(倍率400倍)にて観察し、陽性細胞を数えた。各試料で糸の脱落しなかった2眼以上を観察し陽性細胞数の平均値を求め、6段階の強度(—~4+)で表現した(表1)。

III 結 果

1. 結紮縫合群における浸潤細胞

1) 10-0ナイロン糸(表2)(図1)

術後1日目では陽性細胞を認めなかった。3日ではOX6陽性細胞が一視野に1~2コ浸潤していた以外

表2 10-0ナイロン糸の各陽性細胞、結紮縫合では各陽性細胞は2週でピークに達し、以後減少した。層間挿入は結紮縫合より弱い浸潤であった。

	W3/13	W3/25	OX8	OX6
結紮縫合 1W	—	—	—	—
3W	—	—	—	±
1W	+	+	±	+
2W	++	++	++	+++
4W	++	++	±	+
6W	±	±	—	+
層間挿入 1W	±	±	±	+
4W	±	±	±	+
6W	±	±	—	+
抜糸	—	—	—	—
対照	—	—	—	—

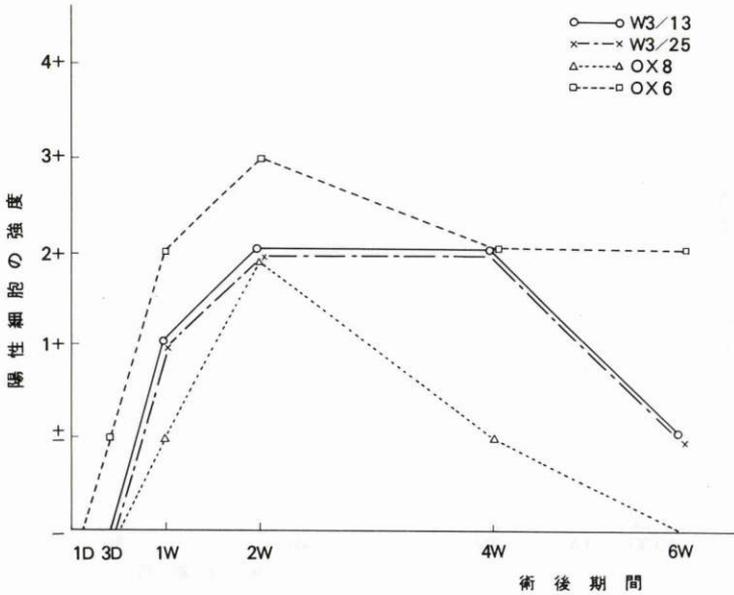


図1 10-0ナイロン糸, 結紮縫合群の各陽性細胞の推移.

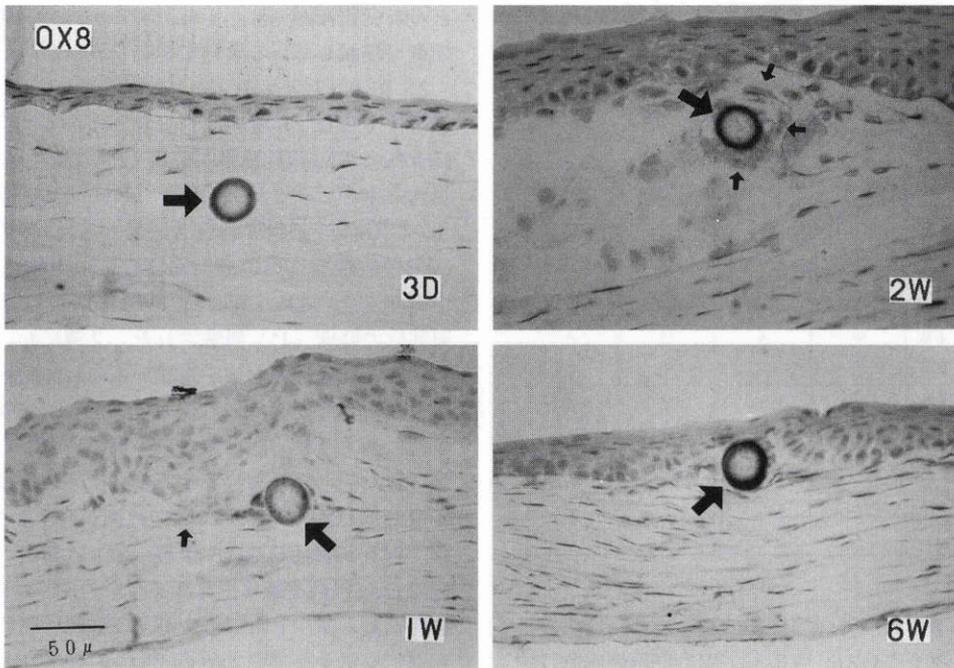


図2 10-0ナイロン糸, OX8陽性細胞の光顕所見 (ABC法, ×400). 小さい矢印は陽性細胞, 大きい矢印は10-0ナイロン糸を示す.

は他の陽性細胞は認めなかった。1週ではOX6陽性細胞が周辺部からび漫性に浸潤し縫合部の実質は中等度に集塊していた(2+)。W3/13, W3/25陽性細胞はとも

に軽度観察されたが(1+) OX8陽性細胞(図2)は極めてわずか(±)であった。2週ではすべての陽性細胞は最も強い浸潤(2+以上)を示し, 特にOX6陽性細胞

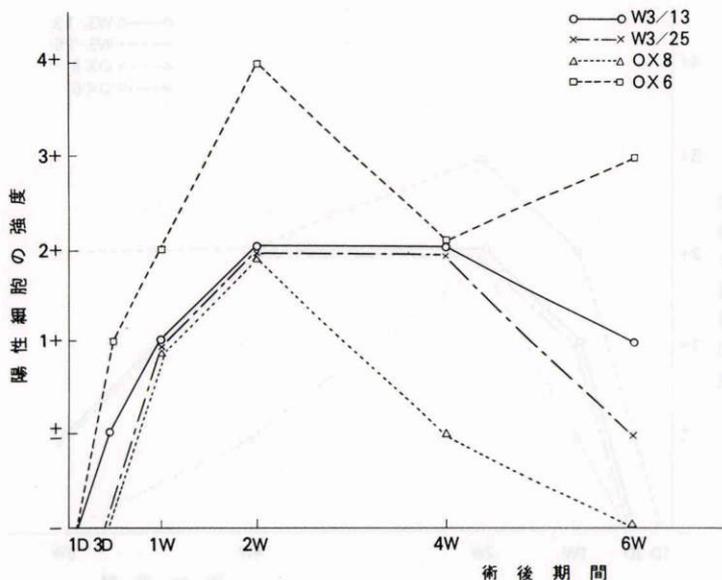


図3 10-0プロリン糸, 結紮縫合群の各陽性細胞の推移.

表3 10-0プロリン糸の各陽性細胞, 10-0ナイロン糸と比較してOX6陽性細胞はピーク時により多く認められたがW3/13, W3/25, OX8陽性細胞の浸潤はほぼ同程度であった. 層間挿入は結紮縫合より弱い浸潤であった.

	W3/13	W3/25	OX8	OX6
結紮縫合				
1D	-	-	-	-
3D	±	-	-	+
1W	+	+	+	±
2W	±	±	±	±
4W	±	±	±	±
6W	+	±	-	±
層間挿入				
1W	±	+	±	+
4W	±	±	±	+
6W	±	±	-	+
抜糸	-	-	-	-
対照	-	-	-	-

胞の浸潤は著しかった(3+). その後全ての陽性細胞は減少し, 4週ではOX6, W3/13, W3/25陽性細胞は中等度の浸潤(2+)を示し, OX8陽性細胞は急激に減少していた(±). 6週ではOX6陽性細胞のみ中等度の浸潤(2+)をみたが, W3/13, W3/25陽性細胞はさらに減少し極めてわずか(±)となり, OX8陽性細胞は全く認められなかった(-). 輪部から血管が術後1週目より侵入し, 2週では縫合糸に達していたが以後はほ

とんど変化なかった. また, 明らかに血管周囲に陽性細胞が浸潤している所見も認められなかった.

2) 10-0プロリン糸 (表3) (図3)

術後1日目では陽性細胞を認めなかった. 3日では縫合部でOX6陽性細胞が軽度(1+)認められ, W3/13陽性細胞が1~2コ浸潤(±)していたが, W3/25(図4)OX8陽性細胞は観察されなかった(-). 1週でOX6陽性細胞は周辺部から縫合部の実質でび漫性に中等度(2+)認め, W3/13, W3/25, OX8陽性細胞も同部位で軽度(1+)観察された. 2週においてはナイロン糸と同様に最も強い浸潤がみられ浸潤細胞は主に実質の縫合糸周囲に多く認められた. OX6陽性細胞は非常に多く(4+)認められ, 一部の上皮にも観察された. また他の陽性細胞も中等度(2+)に観察された.

4週ではOX8陽性細胞は著明に減少(±)したが, W3/13, W3/25陽性細胞は中等度(2+)に観察された. 6週でOX8陽性細胞は全く認めず(-), W3/13, W3/25陽性細胞も減少した(±)が, OX6陽性細胞は4週, 6週でも縫合糸周囲に多く(2+以上)観察された. 10-0ナイロン糸と比較してOX6陽性細胞はピーク時により多く認められたが, W3/13, W3/25, OX8陽性細胞はほぼ同じ強度であった. 輪部からの血管侵入は10-0ナイロン糸と同程度であった.

3) 9-0絹糸 (表4) (図5)

術後1日目ではW3/13陽性細胞は1~2コ浸潤(±)

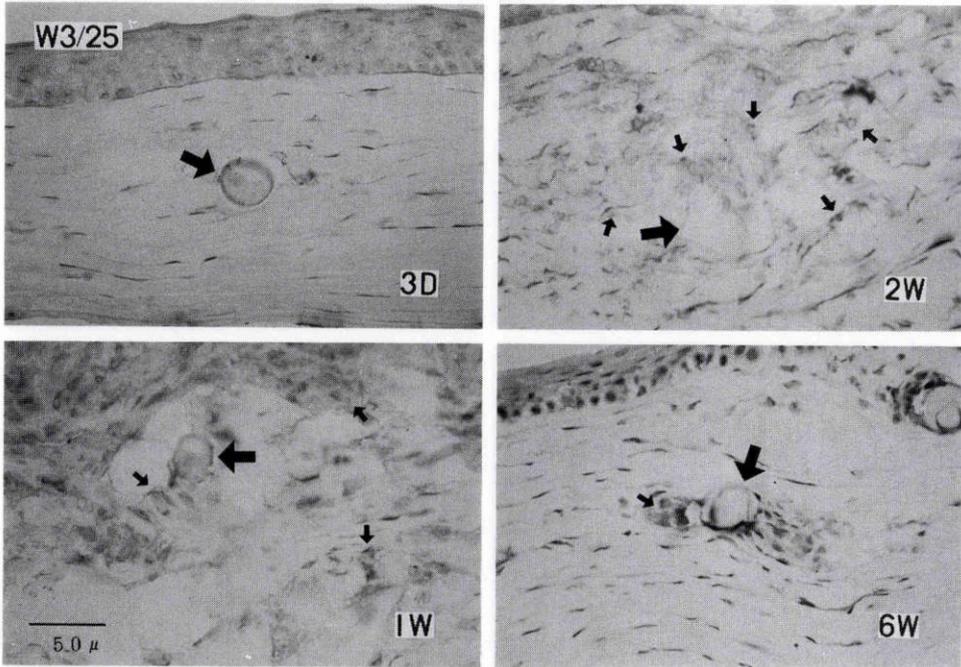


図 4 10-0プロリン糸, W3/25陽性細胞の光顕所見 (ABC法, ×400). 小さい矢印は陽性細胞, 大きい矢印は10-0プロリン糸を示す.

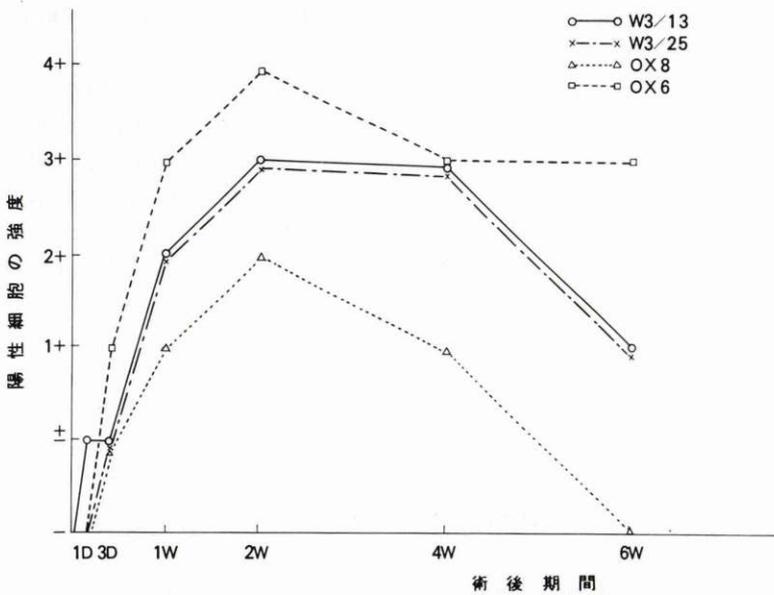


図 5 9-0絹糸, 結紮縫合群の各陽性細胞の推移.

していたが, 他は陰性であった. 3日では W3/13の他, W3/25, OX8陽性細胞も 1~2 コ浸潤 (±) していた. OX6陽性細胞は軽度 (1+) 認められ浸潤が強かった.

1週で各陽性細胞は縫合糸を中心に周辺部まで実質の広範囲に認められ, W3/13(図 6), W3/25陽性細胞は中等度 (2+), OX8陽性細胞は軽度 (1+), OX6陽性細胞

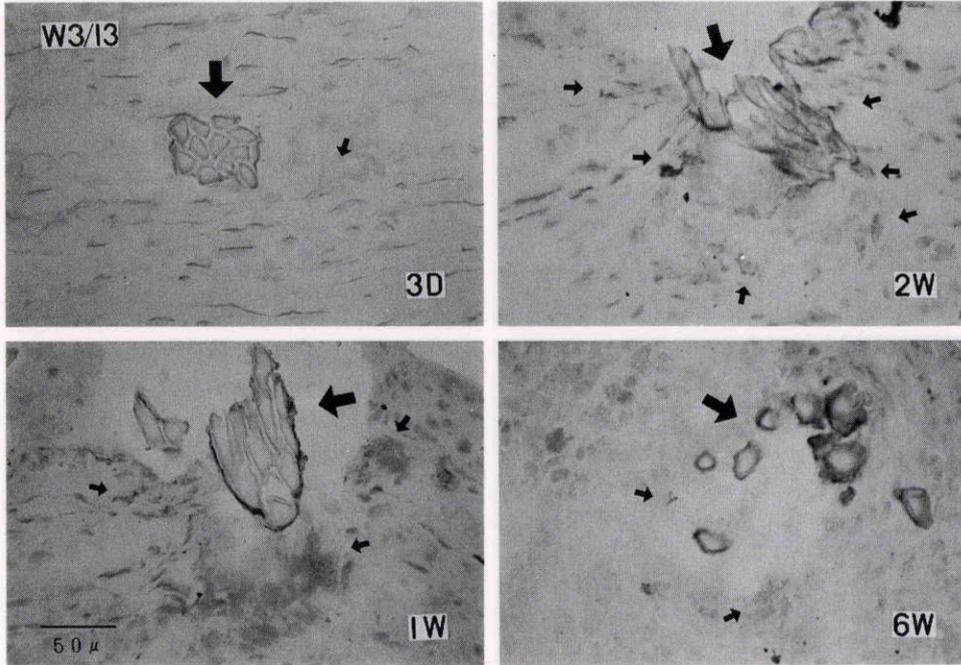


図6 9-0絹糸, W3/13陽性細胞の光顕所見(ABC法, ×400). 小さい矢印は陽性細胞, 大きい矢印は9-0絹糸を示す.

表4 9-0絹糸の各陽性細胞, 結紮縫合, 層間挿入で他の2糸よりも強い浸潤を示した.

	W3/13	W3/25	OX8	OX6
結紮縫合	1 D	±	-	-
	3 D	±	±	+
	1 W	#	#	#
	2 W	#	#	#
	4 W	#	#	+
	6 W	+	+	-
層間挿入	1 W	+	±	#
	4 W	+	±	#
	6 W	+	±	#
抜糸	-	-	-	-
対照	-	-	-	-

胞(図7)は強く(3+)浸潤していた。2週では各陽性細胞の強度はピークに達し、主に縫合部の実質および上皮層に認められ、他の2糸よりも強い浸潤を示した。OX8陽性細胞のみ4週で減少し6週で陰性となったが、W3/13, W3/25陽性細胞は6週においても軽度(1+)浸潤していた。OX6陽性細胞は6週でも多く(3+)認められた。輪部からの血管侵入は6週でナイロン糸よりもやや強かった。

2. 層間挿入群における浸潤細胞

1) 10-0ナイロン糸(表2)

各陽性細胞は縫合糸周囲に1週ですべて出現したが、W3/13, W3/25, OX8陽性細胞は1~2コの浸潤(±)であり、OX6陽性細胞も軽度(1+)であった。4週, 6週においても同程度の浸潤であった。浸潤細胞は縫合群と同様にOX6陽性細胞が最も著しかったが、結紮縫合と比較すると各陽性細胞の浸潤は少なかった(図8)。輪部からの血管侵入は6週でもほとんど認められなかった。

2) 10-0プロロン糸(表3)

各陽性細胞は縫合糸周囲に1週ですべて認められ、4週, 6週でも10-0ナイロン糸とほぼ同様の結果であった。結紮縫合と比較すると10-0ナイロン糸と同様、各陽性細胞は少なかった。血管侵入は6週で認めなかった。

3) 9-0絹糸(表4)

各陽性細胞は1週で縫合糸周囲にすべて認められ、4週, 6週でも観察された。結紮縫合の結果と同様、他の2糸よりも各陽性細胞は多く認められた。特にOX6陽性細胞は結紮縫合とほぼ同程度に著しく観察された。

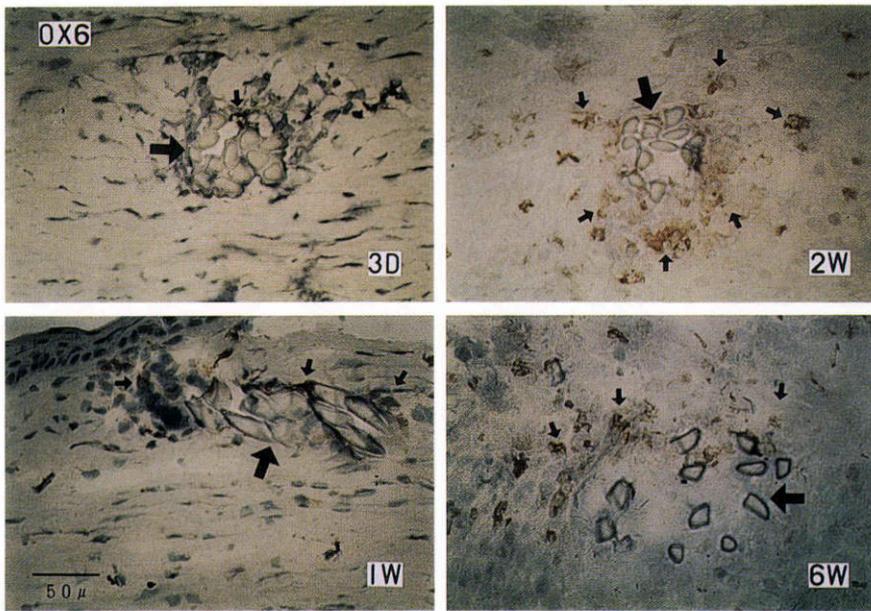


図 7 9-0 絹糸, OX6 陽性細胞の光顕所見 (ABC 法, ×400). 小さい矢印は陽性細胞, 大きい矢印は 9-0 絹糸を示す.

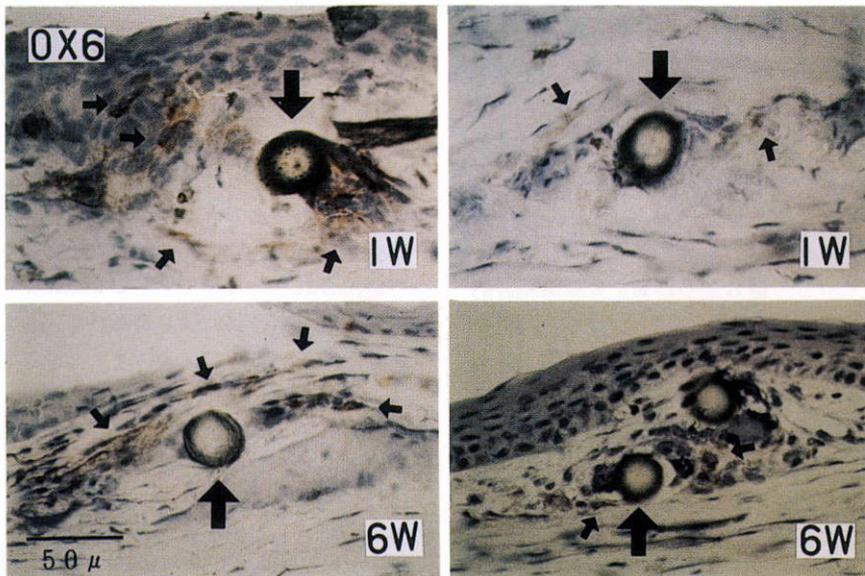


図 8 10-0 ナイロン糸, OX6 陽性細胞の結紮縫合 (左) と層間挿入 (右) の比較 (ABC 法, ×400). 小さい矢印は陽性細胞, 大きい矢印は 10-0 ナイロン糸を示す.

3. 抜糸群における浸潤細胞 (表 2, 3, 4)

3 糸において結紮縫合ではどの陽性細胞も 2 週で最も多く認められたが, その時点で抜糸すると 4 週後に

はすべての陽性細胞は消失した.

4. 対照 (表 2, 3, 4)

正常ウイスターラット角膜では陽性細胞は全く観察

されなかった。また、角膜を半層切開しそれぞれの針つき糸を角膜実質に通糸のみ行った1週後の眼においても、すべての陽性細胞は角膜に認められなかった。

IV 考 按

1. モノクローナル抗体の特異性について

免疫酵素抗体法(ABC法)は従来の間接法、PAP法よりも非常に感度が高い¹⁾とされている。今回用いたモノクローナル抗体の組織標本での特異性については高村²⁾が基礎実験としてラット脾臓切片を染色して証明している。W3/13はTリンパ球、好中球に反応するとされており、W3/13が非常に多く認められW3/25、OX8がnegativeならば好中球の浸潤であると考えられるが、術後早期を除いてそのような関係は今回見られなかった。従ってW3/13陽性細胞は主にTリンパ球であると考えられた。またW3/25はヘルパー/インデューサーTリンパ球、OX8は細胞障害性/サプレッサーTリンパ球に反応しTリンパ球サブクラスを示すとされており、今回の結果でもW3/25陽性細胞とOX8陽性細胞の合計はほぼW3/13陽性細胞の数に一致した。OX6はIa抗原に特異的に反応する。Ia抗原を保有する細胞にはBリンパ球、マクロファージ、ランゲルハンス細胞等が主に知られているが、最近 γ -インターフェロンを用いた培養で角膜実質細胞もIa抗原陽性を呈するとの報告³⁾もみられる。我々の結果では実質のIa抗原陽性細胞は3日目で周辺部からび漫性に認められ、輪部からの浸潤が考えられ形態的にマクロファージと思われた。

2. 浸潤細胞について

これまで角膜における縫合糸の影響を免疫組織学的に検討した報告は少ない。田川ら^{4)~6)}は、マウス角膜に10-0ナイロン糸及び9-0絹糸を縫合すると、角膜上皮層にランゲルハンス細胞やTリンパ球が浸潤することを証明し、縫合糸が免疫系細胞を角膜に浸潤させる刺激となり、何らかの免疫現象に関与する可能性を示唆しているが、角膜全層での観察はされておらず、またリンパ球のサブクラスについても検討されていない。

著者らはこれまでラットの同種間(村松ら、第2回角膜移植学会、1986)、同系間(園田ら、第11回角膜カンファランス、1987)の角膜表層移植モデルを作製し、浸潤細胞を検討した結果、遺伝的に同一な同系のLewisラット間の移植においてもヘルパー/インデューサーTリンパ球、細胞障害性/サプレッサーTリンパ球及び抗原提示細胞であるIa抗原陽性細胞が

縫合部を中心に認められ縫合糸の影響が示唆された。そこでこの様な反応が縫合糸単独でもおこりうるかを検討したのが今回の実験である。

結果に示したごとく対照においては各陽性細胞をまったく認めなかったことから、結紮縫合や層間移植で見られたTリンパ球、Ia抗原陽性細胞の浸潤は縫合糸による影響と考えられた。結紮縫合による反応の特徴として3種類の糸で次のような共通のパターンが認められた。すなわち、(1) Tリンパ球、Ia抗原陽性細胞の浸潤は1週以内に周辺部から縫合糸周囲でび漫性に認められた。(2) 2週においてそれらは最も著しく観察された。(3) ヘルパー/インデューサーTリンパ球は細胞障害性/サプレッサーTリンパ球よりも常に多く浸潤していた。細胞障害性/サプレッサーTリンパ球は2週以後は消失した。(4) Ia抗原陽性細胞は全経過中最も多く観察され、6週においてもかなり多く認められた。これらの結果は角膜を切開し通糸のみを行った対照では全く認められなかったことから、創傷治療に対してよりも縫合糸の異物反応に免疫担当細胞が関与したものと考えられた。

Aronsonら⁷⁾⁸⁾は角膜における縫合糸の炎症性反応を臨床的及び組織学的に検討し、9-0絹糸は10-0ナイロン糸よりも血管侵入や浸潤細胞が強くみられ、絹糸は γ -グロブリンとの結合性が強い⁹⁾ために角膜の炎症性反応が強いと考えた。今回ラット角膜でも結紮縫合、層間挿入で9-0絹糸は3種の中で最も強い反応を示した。絹糸でこれらの浸潤細胞が強くみられたことは従来から報告されている絹糸の抗原性の強さや刺激性を示唆する結果と思われた。また生体内移植の材質として応用されているポリプロピレンは化学的にも安定性が高く¹⁰⁾、結合組織反応、炎症性反応が最も少ない¹¹⁾と報告されているが、10-0プロリン糸においても実質内にIa抗原陽性細胞、Tリンパ球が観察され、10-0ナイロン糸と差を認めなかったことは、プロリンでも免疫反応に関与する要素があると思われた。ポリプロピレンは眼内レンズのループとしてもよく用いられており、今後これらの生体に対する反応も検討する必要があるかと思われる。

3. 機械的刺激について

結紮縫合した場合debrisの関与もあるが、結び目による上皮障害や血管侵入がおこり、機械的刺激により浸潤細胞が出現することが考えられる。しかし、機械的刺激を除去した層間挿入群でも結紮縫合同様にそれぞれの糸周囲にIa抗原陽性細胞、Tリンパ球などの

浸潤を認めたことは、これらの細胞が糸という異物に対して反応性に出現することを示唆している。また結紮縫合でより多く浸潤細胞が観察され、輪部からの血管侵入も著明になることから、機械的刺激が免疫担当細胞を増加させる因子となると思われた。

一方、各縫合糸で最も浸潤細胞が多い2週の時点で抜糸すると、すべての浸潤細胞が4週間には消失していた。この点も浸潤細胞に対する縫合糸の影響を明らかにしている。

角膜移植手術では10-0ナイロン糸を埋め込みのまま抜糸しない例もあるが、これらの陽性細胞を消失させるためにはなるべく早期の抜糸が望まれる。日常診療では、移植後数カ月してからの抜糸を契期に拒絶反応が発現されることがみられる。これは縫合糸周囲に残存していた免疫担当細胞が抜糸という操作を引き金として起こす可能性が考えられ、今後は糸の研究とともに実験的角膜移植の拒絶反応について検討していく予定である。

本稿の要旨は第92回日本眼科学会総会において報告した。ご校閲いただいた松尾治且教授、臼井正彦教授に深謝いたします。また直接ご指導頂いた村松隆次講師に感謝します。

文 献

- 1) **Hsu SM, Raine L, Fanger H**: Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29: 577—580, 1981.
- 2) **高村健太郎**: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)におけるリンパ球サブセットの解析. *眼紀* 36: 2125—2133, 1985.
- 3) **Young E, Walter JS, Prendergast RA, et al**: Immunology of corneal allograft rejection: HLA-DR antigens on human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 571—574, 1985.
- 4) **田川義継, 竹内 勉, 松田英彦**: 縫合糸による局所免疫細胞の角膜上皮層への浸潤. 第9回角膜カンファレンス抄録集, 18, 1985.
- 5) **田川義継, 竹内 勉, 小熊淑記, 他**: 角膜縫合糸の局所免疫細胞に対する影響. *日眼会誌* 89(抄録): 116, 1985.
- 6) **Tagawa Y, Kitagawa F, Matsuda H**: The effect of topical anti-Ia antibodies on ocular surface Langerhans cells and Thy-1 lymphocytes. In M Usui, S Ohno, K Aoki (eds): *Ocular Immunology Today*, 447—449, Excerpta Medica, Amsterdam New York Oxford, 1990.
- 7) **Aronson SB, Moore TE**: Suture reaction in the rabbit cornea. *Arch Ophthalmol* 82: 531—536, 1969.
- 8) **Moore TE, Aronson SB**: Suture reaction in the human cornea. *Arch Ophthalmol* 82: 575—579, 1969.
- 9) **Aronson SB, McMaster PRB, Moore TE**: The pathogenesis of suture toxicity. *Arch Ophthalmol* 84: 641—644, 1970.
- 10) **Kronenthal RL**: Intraocular degradation of nonabsorbable sutures. *Am Intra-Ocular Implant Soc J* 3: 222—228, 1977.
- 11) **Miller JM**: Evaluation of a new surgical suture (prolene). *American Surgeon* 39: 31—39, 1973.