

ラットにおける keratoepithelioplasty モデルの作製と その組織学的検討

天野 史郎¹⁾, 澤 充²⁾, 石井 康雄³⁾

¹⁾東京大学医学部眼科学教室, ²⁾東京大学医学部角膜移植部, ³⁾新川橋病院眼科

要 約

ルイスラットを用いた keratoepithelioplasty (KEP) のモデルを作成し, その組織学的検討を行った。ルイスラットの角膜上皮をスパーテルで機械的に剝離し, 輪部を含めて 1.5 mm の範囲の結膜組織を切除した後, 他のルイスラットの角膜から作製した大きさ約 3 mm×1.5 mm の 1 片の角膜上皮片 (lenticule) を輪部に縫着した。Lenticule 縫着部では角膜内への血管侵入が, lenticule 非縫着部と比較して少なく, lenticule に隣接する角膜においてのみ角膜の透明性が保たれた。結膜からの血管侵入は, lenticule 内には少なく, lenticule 縫着部では, lenticule の下から角膜の深層にのみみられた。Lenticule により角膜上皮と血管との間に距離が置かれることが, KEP の奏効機序であることが示唆された。また, このモデルにおいて, lenticule の働きを検討することができたことより, このモデルが, KEP の研究に有用であることが確認された。(日眼会誌 96: 1366-1372, 1992)

キーワード: Keratoepithelioplasty, ラット, 動物モデル

Histological Study of a Model of Keratoepithelioplasty in the Rat

Shiro Amano¹⁾, Mitsuru Sawa²⁾ and Yasuo Ishii³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

²⁾Section of Corneal Transplantation, University of Tokyo School of Medicine

³⁾Eye Clinic, Shinkawabashi Hospital

Abstract

A model for keratoepithelioplasty (KEP) was developed using the Lewis rat, and histological studies were performed using the model. The entire corneal epithelium was removed using a spatula and a 1.5-mm-width of the conjunctiva including the limbus was excised. An oval corneal lamellar graft (3×1.5 mm) with an intact epithelium taken from another Lewis rat was transplanted on the denuded limbus. Biomicroscopic observation showed significantly less vascular invasion in the part of the cornea adjacent to the lenticule than in other part of cornea, and clear cornea was maintained in the cornea adjacent to the lenticule. Histologically only few vessels were recognized in the lenticule, and the epithelial cells on the lenticule showed histological characteristics of corneal epithelium. These results indicate that surgical function of KEP can be obtained because the lenticules keep distance between corneal epithelium and conjunctival vessels. And it is also confirmed that this model is useful in research on the pathophysiological mechanism of KEP. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1366-1372, 1992)

Key words: Keratoepithelioplasty, Rat, Animal model

別刷請求先: 113 文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 天野 史郎

(平成 3 年 11 月 27 日受付, 平成 4 年 5 月 18 日改訂受理)

Reprint requests to: Shiro Amano, M.D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine. 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

(Received November 27, 1991 and accepted in revised form May 18, 1992)

I 緒 言

Keratoepithelioplasty (KEP) は化学腐蝕眼等における遷延性の角膜上皮欠損に対する治療法として、1984年に Thoft¹⁾により開発、報告された手術法である。現在では、KEP は結膜組織の角膜内侵入をきたす疾患群にたいして、結膜組織の角膜への侵入を阻止し、ocular surface の再構築を目的として行われることが多い^{2)~7)}。

KEP の奏効機序や拒絶反応に関する検討は、臨床面からも行われているが、限界があることはいなめない。KEP の動物モデルを作成し、組織学的な手法を用いた検討を行うことは、この手術の細胞生物学的な特徴を明らかにし、さらに、ocular surface を構成する角結膜上皮細胞の病態生理の解明につながると考えられる。我々は、KEP を、結膜組織内に角膜を移植した際の反応モデルと考え、角膜と輪部との上皮を切除し結膜組織が角膜内へ侵入する状態を作製後、角膜上皮片 (lenticule) を上皮切除部に移植し、その前眼部観察、組織学的検討を行った。

II 実験方法

1. 実験動物および手術方法

レシビエントとして、生後8週のルイスラット(8匹, 8眼)、ドナーとしては、lenticule 作製を容易にするために、生後16週のルイスラット(2匹, 4眼)を用いた。塩酸ケタミン(ケタラル®、三共)25 mg/kg 体重、キシラジン塩酸塩(セラクター®、パイエル)5 mg/kg 体重の筋肉内注射による全身麻酔下で、手術用顕微鏡を用いて、レシビエントとなるラットの右眼の角膜上皮をスパーテルで機械的に剝離し、さらに輪部を含めて1.5 mm の範囲の結膜組織を結膜剪刀で切除した。左眼は無処置とした。同様の方法で全身麻酔をしたドナーのルイスラットの両眼の透明角膜部から、手術用メス(オプタルミックナイフ®, アルコン)を用いて、角膜上皮と前部角膜実質を含む、大きさ長軸約3 mm、短軸約1.5 mm の楕円形 lenticule を1眼から2片ずつ作製した。レシビエント輪部に、lenticule の長軸が輪部に沿う方向に、1片の lenticule の長軸端を10-0 ナイロン(エチロン®, エチコン)1針ずつ、計2針で縫着した。手術終了時に7-0 バイクリル(コーティッドバイクリル®, エチコン)2針で眼瞼縫合を行い、4日後に眼瞼縫合糸を切除した。

2. 対照群

右眼の角膜上皮剝離、結膜組織の切除のみを行い、lenticule の縫着を行わなかったルイスラット(8匹, 8眼)を対照群とした。

3. 観察項目および試料作製法

手術後2か月間の前眼部観察と組織学的観察を以下のように行った。前眼部写真は、手術用顕微鏡に取り付けたカメラを用いて撮影し、経時の変化を記録した。KEP 群、対照群とも8眼の内4眼では、術後2日目と3日目に、前述と同様の全身麻酔下で、眼瞼縫合糸を切除し、1%メチレンブルーを点眼し、上皮欠損の範囲の観察を行い、再び眼瞼縫合を行った。術後1週、2週、1か月、2か月目に眼球を摘出し、lenticule の中央を通る経線に沿って眼球を半割した後、以下のように各試料を作製した。伸展標本は、半割した強角膜切片を Tseng ら⁸⁾の方法を参考に作製した。すなわち65%アルコール、5%酢酸、2%ホルムアルデヒドからなる固定液で30分間固定、アルコール系列による水和後、ベリオディックアシッドシフ染色(以下PAS染色と略す)を行い、アルコール系列で脱水し、スライドグラスに伸展させて恒温槽で乾燥したのち、封入を行った。光学顕微鏡観察用試料は、10%ホルマリンで1日固定した後、通常組織学的手法でパラフィン包埋し、光学顕微鏡用切片を作製し、PAS染色およびヘマトキシリンエオジン染色(以下HE染色と略す)を行った。電子顕微鏡観察用試料は、2.5%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液(0.1 mol/l, pH 7.4)で10分間固定後、同液中で細切し、さらに同液にて12時間固定した。1%四酸化オスミウム燐酸緩衝液(0.1 mol/l, pH 7.4)で1時間後固定を行い、エタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドをへて、エポキシ樹脂に包埋した。包埋材料から1 μ m 切片を作成し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で観察した。また、超薄切片は、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の2重染色後、電子顕微鏡(日電子100C型)で観察した。

III 結 果

1. 前眼部所見

1) KEP 群

KEP 群では、8眼中6眼で lenticule が縫着部位から脱落せずに経過した。これら6眼では、術後3日目にはメチレンブルー染色部は lenticule 縫着部から最も遠い対側の輪部付近のみとなり(図1)、術後4日目前後に上皮の被覆が終了した。次いで、術後1週間後

に角膜全周から強い血管侵入が生じた。しかし術後2週目以降、lenticuleのある部分では、他の部分より角膜内への血管侵入が少なく、lenticule周囲とそれに隣接する角膜では角膜の透明性が保たれていた(図2)。術後2か月目の時点においては、lenticule部分で、術後1か月目と同様に、角膜内への血管の侵入が少なく、lenticuleのない部分から角膜内に侵入していた血管は、術後1か月目よりもわずかに退縮し、角膜中央部の透明な部分が拡大していた。

一方、術後1週目までにlenticuleの脱落した2眼では、lenticuleの縫着を行った部位においても、他の部分同様の血管侵入があり、後述する対照群と同一所見を示した。術後2か月目では、角膜中央部まで達して



図1 KEP群、術後3日目の前眼部写真。矢印はlenticule中央部。メチレンブルーに染色される上皮欠損部はlenticuleから最も遠い対側の輪部付近のみにみられる。



図2 KEP群、術後1か月目の前眼部写真。矢印がlenticule中央部。Lenticuleのある部分で、他の部分より角膜内への血管侵入が少なく、lenticuleに隣接する角膜では角膜の透明性が保たれている。

いた血管が輪部から1~2mmの所まで退縮し、角膜中央部にはghost vesselsがみられた。

2) 対照群

対照群では、術後3日目にメチレンブルーで染色される上皮欠損部は角膜中央の直径1~2mmほどの円内となっていた。術後約1週間目から、全8眼において角膜全周で強い血管侵入が起こり、術後1か月目には角膜中央部を含め新生血管の侵入があった(図3)。術後2か月目まで観察した2眼では、術後2か月目の時点で血管は輪部から1~2mmの所まで退縮し、角膜中央部にはghost vesselsがみられた。

2. 組織学的所見

1) KEP群

Lenticuleの脱落しなかった眼における結果についてまず述べる。術後1週目には角膜は杯細胞を含まない3~4層の上皮で覆われ、実質内には多数の炎症細胞の浸潤をみた。術後2週目と1か月目では、結膜からの血管は、lenticule内では深層にわずかにみられるのみで、lenticuleの下から角膜実質深層に侵入していた(図4)。術後1か月目の、透過型電子顕微鏡による観察では、lenticule結膜側端上の上皮には杯細胞が含まれていた(図5)。Lenticule中央の上皮細胞には、杯細胞はみられなかった。Lenticule中央の上皮基底細胞は、円柱形である事、その細胞質内には結膜上皮細胞にみられるような束状の中間フィラメントが見られない事、ミトコンドリアが核よりも基底膜側に多く分布するなど角膜上皮細胞様の細胞内小器官の分布を示している事など、角膜上皮としての組織所見を示していた(図6)。また、上皮基底細胞は実質内へ細胞突

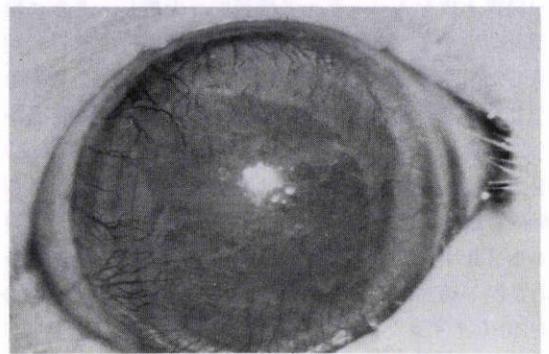


図3 対照群、術後1か月目の前眼部写真。角膜中央部まで血管の侵入をみる。

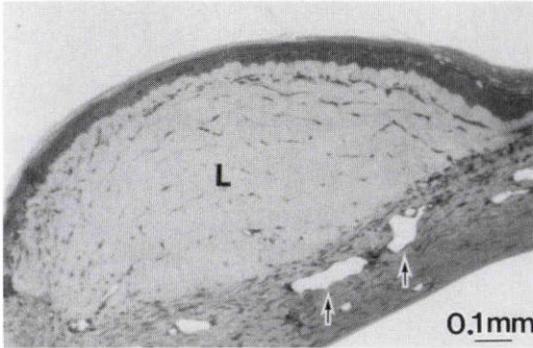


図4 KEP群, 術後1日目, lenticule 周辺の光顕像. 右が角膜側, 左が結膜側, 結膜からの血管は lenticule 内と角膜上皮下には侵入せず, lenticule の下から角膜実質深層に侵入している (矢印). (トルイジンブルー染色, ×50) L: lenticule

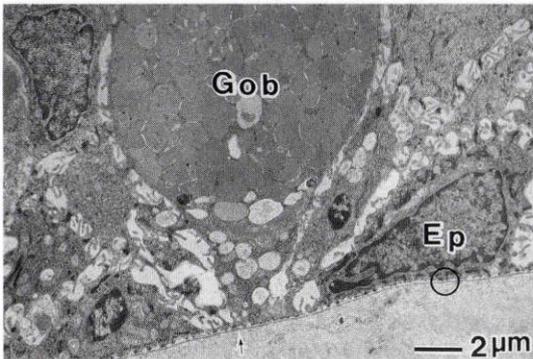


図5 KEP群, 術後1か月目, lenticule 結膜側端の TEM 像. 上皮には杯細胞 (Gob) が含まれる. 基底膜 (矢印) と hemidesmosome (丸印) の形成をみる. (×3,000) Ep: 上皮基底細胞

起を出し, 基底膜はこの細胞突起に沿ってみられた(図6). Lenticule 角膜側端上の上皮基底細胞は, lenticule 中央と同様に, 中間フィラメントや細胞内小器官の状態など, 角膜上皮としての組織所見を示していたが, lenticule 中央の上皮と比較して, 基底細胞の基底膜への hemidesmosome が多く, また実質内への細胞突起はみられなかった(図7). Lenticule 深層ではわずかに血管侵入があったが, これらの血管の多くでは内皮細胞の変性(図8)があり, 消退しつつある血管と考えられた. Lenticule 対側の輪部付近では, 角膜実質全層の血管の侵入と杯細胞を含む上皮をみた. 術後1か月目の伸展標本では, 杯細胞は lenticule の結膜断端ま

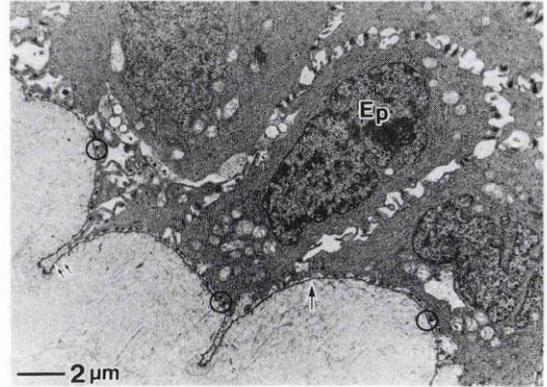


図6 KEP群, 術後1か月目, lenticule 中央部上皮の TEM 像. 上皮基底細胞 (Ep) から実質内へ細胞突起 (2重矢印) が伸び, 基底膜 (矢印) と hemidesmosome (丸印) の形成をみる. 上皮基底細胞は, 円柱形であり, 束状の中間フィラメントが細胞質に見られず, 角膜上皮細胞様の細胞内小器官の分布を示している事など, 角膜上皮としての組織所見を示している (×3,000).

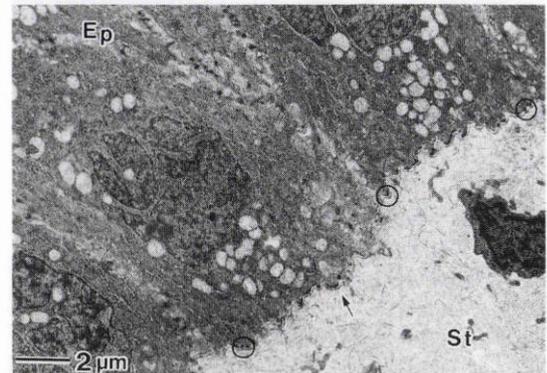


図7 KEP群, 術後1か月目, lenticule 角膜側端上皮の TEM 像. Lenticule 結膜側端や lenticule 中央より多くの hemidesmosome (丸印) の形成をみる (×3,000). 矢印: 基底膜, Ep: 上皮基底細胞, St: 角膜実質

でみられたが, それより角膜側にはみられなかった(図9). 術後2か月目では, lenticule 上の上皮細胞間の浮腫の軽減が見られたが, 結膜からの血管は lenticule 内と角膜上皮下には少なく, lenticule から角膜中央にかけて角膜上皮様の上皮が覆っている所見は術後1か月目と同様であった.

Lenticule が脱落した2眼では, 術後1か月目, 2か

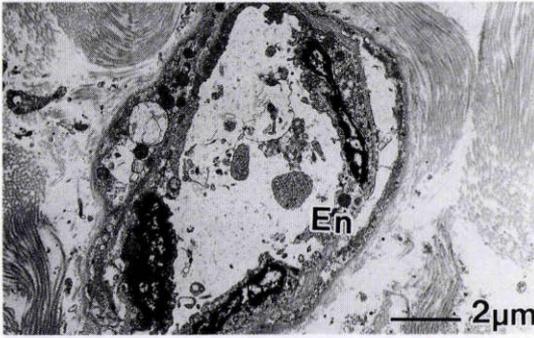


図8 KEP群, 術後1か月目, lenticule 深層の血管のTEM像.
内皮細胞 (En) の変性像をみる. ($\times 4,500$)

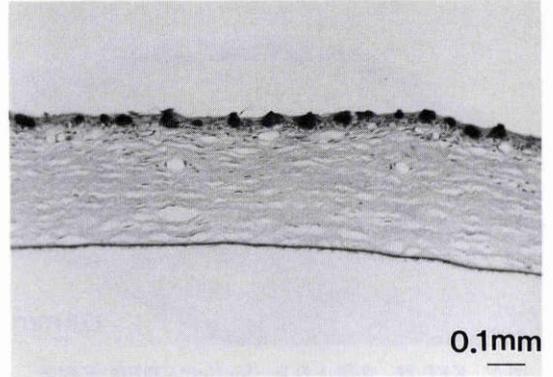


図10 対照群, 術後1か月目, 角膜中央部の光顕像.
角膜実質中層から浅層にかけての血管侵入と, 杯細胞の多く含まれる上皮による角膜の被覆がみられる.
(PAS染色, $\times 50$)



図9 KEP群, 術後1か月目, lenticule 部の伸展標本.
杯細胞は lenticule の結膜側端までみられ, それより角膜側にはみられない. (PAS染色, $\times 50$)
L: lenticule

月目どちらの時点での組織においても, 縫合糸は残っているが, lenticule は消失しており, lenticule 縫着部分も, 結膜上皮によって覆われていた.

2) 対照群

術後2週目と1か月目では, 角膜実質中層から浅層にかけての血管侵入と, 杯細胞の多く含まれる上皮による角膜被覆がみられた(図10). 術後2か月目では, 角膜中央部で新生血管の消退があり, その部分の上皮には杯細胞は含まれず, 透過型電子顕微鏡所見も, KEP群の lenticule 上の上皮同様, 角膜上皮様であった.

IV 考 按

今回のラットモデルでは, lenticule により角膜への血管侵入が抑制され, lenticule の働きを検討すること

ができた. ただし, KEP群の8眼の内2眼では, lenticule の脱落がみられ, 眼瞼縫合の期間, lenticule の大きさや縫合法などに改善の余地があると考えられる.

臨床において KEP は, 病的な角膜に対して, 同種移植片 (allograft) を用いて行われている. 今回のモデルはいくつかの点で, KEP の臨床例のありのままのモデルとはいえない. ひとつは, 同種同系の移植片 (syngeneic graft) を用いており拒絶反応を伴わない点である. 同種移植片を用いたモデルは今後検討していく予定であるが, lenticule の働きを検討するという今回の目的には, むしろ拒絶反応を伴わない方が適していると考えられた. 二つめは, lenticule を1片のみしか縫着せず, lenticule 縫着部以外からの血管侵入を許している点である. Lenticule を輪部全周に置くことは技術的に困難である一方, lenticule を置かない部分との比較をすることで, lenticule の効果をより明らかにすることができると考えた. 三つめは, 角膜と輪部上皮とを除去したのみで, 角膜実質には直接の障害はない状態に lenticule の移植を行っている点である. 角膜および輪部の状態については, アルカリで角膜実質に障害を与えた上で KEP を行ったモデルの報告⁹⁾もあるが, 角膜実質に直接障害を与えない今回のモデルにおいても, KEP 施行眼の lenticule のない部分や, 対照群では, 角膜実質の浅層から中層にかけての新生血管侵入をみており, 角膜内への新生血管侵入に対する lenticule の効果を見ることができると考えられた. これまで, 角膜上皮除去にしばしば用いられてきた

N-ヘプタノールを用いて、角膜および輪部上皮を除去した場合、血管と結膜組織の角膜内への侵入が起こる時と起こらない時がある¹⁰⁾。その原因としては、輪部上皮が完全に除去されている場合と除去されていない場合があるためという考えが示されている¹⁰⁾。角膜内への血管侵入に対する lenticule の効果を観察する本モデルにおいては、角膜内への血管侵入を確実に起こすために、角膜および輪部上皮が完全に切除されている必要がある。そこで我々は、角膜の上皮を機械的に剝離した後に、角膜周囲 1.5 mm の範囲の結膜組織をも切除するようにした。対照群全眼の角膜全周と KEP 群の lenticule 非縫着部において、血管と結膜組織の角膜内への侵入が観察されたことは、手術によって、角膜および輪部上皮を完全に切除することができた事を示していると考えられた。

術後早期の前眼部の観察で、lenticule の対側の輪部付近に上皮欠損が最後まで残ったことは、lenticule 上の上皮によって一度は角膜の上皮被覆が行われたことを示していると考えられる。その後 lenticule のない部分から、新生血管と杯細胞を含む結膜上皮が侵入したことが確かめられた。血管が侵入しなかった角膜中央部と、lenticule で血管侵入が抑制された部分では上皮は角膜上皮様であった。以上の所見は、血管の存在と結膜上皮の存在との間に密接な関係があるとの報告^{8)11)~13)}と一致する。組織学的検討では、lenticule の下から角膜深層に血管侵入があっても、lenticule 上の上皮は角膜上皮様である事が確認された。こうした結果から、KEP においては、lenticule の存在が上皮と血管との間に距離をおくことになり、lenticule 上の上皮が血流のない環境下におかれ、角膜上皮様であり続け、また角膜上皮は結膜上皮よりも新生血管誘導効果が小さいため^{14)~16)}、さらに血管侵入が抑制される、という関連が示唆された。こうした、血管と上皮の相互作用に、lenticule の存在が影響を及ぼすことが、KEP の奏効機序の一部であると考えられた。

本モデルでは、KEP 群と対照群のいずれにおいても、角膜内へ侵入していた血管の角膜中央部よりの部分が、術後 1 か月から 2 か月の間に ghost vessels となっていた。この所見は lenticule の有無にかかわらずみられ、術後炎症の鎮静とともに新生血管が ghost vessel 化したものと考えられる。新生血管の ghost vessel 化は、lenticule の有無にかかわらずみられたことより、こうした変化の現れる時点では、結膜組織の角膜内侵入に対する lenticule の抑制効果を判定する

事は適切でないと考えられる。Tseng ら⁸⁾は、N-ヘプタノールを用いて家兎の角膜と輪部結膜の上皮を除去した後、角膜内に血管新生を多くみた群では、上皮被覆後 167 日目においても、角膜上に高密度の杯細胞をみたと述べている。この報告においては、167 日目の角膜内の新生血管の状態は詳述されていないが、杯細胞の密度は、上皮被覆後 57 日目と比較して、167 日目では角膜中央部ほど低くなっており、今回の我々の結果と矛盾しないものである。また、Buck¹⁷⁾は、マウスの全角膜上皮を N-ヘプタノールで除去した後の観察で、術後 7 か月の時点においても、角膜実質内に術後早期と同様の新生血管をみたと述べている。この報告では、我々がみた角膜内新生血管の退縮はみられていないが、上皮剝離の方法や範囲の違い、用いた動物の違いなどが、結果の違いにつながった可能性が考えられる。

近年、角膜および輪部上皮細胞内のケラチンのパターンの検討等から、角膜上皮の幹細胞は輪部上皮の基底細胞にあると考えられてきている¹⁸⁾¹⁹⁾。今回の lenticule は、ドナー角膜の中央から周辺にかけての角膜上皮および実質から作成したもので、輪部上皮を含まない。また、角膜表層移植片上の上皮細胞は、宿主の上皮細胞に徐々に置き代わっていく事が知られており²⁰⁾、移植された lenticule 上にあった角膜上皮細胞は、移植後増殖伸展して一旦は角膜を被覆するものの、時間とともに脱落し、宿主の結膜から侵入してくる上皮に置き代わっていくと考えられる。術後 2 か月目で lenticule から角膜中央部までを覆う角膜上皮様の細胞の由来は、lenticule 上に始めからあった角膜上皮細胞だけでなく、周囲より入った結膜上皮細胞が、血流の少ない環境下で角膜上皮へ transdifferentiation したものも含まれると考える事が妥当と思われるが、この点に関してはさらに検討が必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、増田寛次郎教授の御校閲に深謝いたします。

文 献

- 1) Thoft RA: Keratoepithelioplasty. Am J Ophthalmol 97: 1-6, 1984.
- 2) 大橋裕一, 木下 茂, 真鍋禮三: Stevens-Johnson 症候群に対する Keratoepithelioplasty の手術成績. 眼臨 80: 204-208, 1986.
- 3) 木下 茂, 大橋裕一, 真鍋禮三: 角膜腐蝕に対する角膜上皮形成術 keratoepithelioplasty. 臨眼 41: 21-26, 1987.
- 4) 山口達也, 大越貴志子, 松葉裕実, 他: Keratoepithelioplasty の翼状片再発例への応用. 眼紀

- 40: 835—839, 1989.
- 5) 木下 茂, 大橋裕一, 大路正人, 他: 蚕食性角膜潰瘍に対する keratoepithelioplasty の長期予後. 臨眼 43: 737—740, 1989.
 - 6) 天野史郎, 佐藤 致, 木村内子, 他: 蚕蝕性角膜潰瘍に対する keratoepithelioplasty と表層角膜移植の治療成績. 臨眼 44: 1801—1804, 1990.
 - 7) Turgeon PW, Nauheim RC Roat MI, et al: Indications for keratoepithelioplasty. Arch Ophthalmol 108: 233—236, 1990.
 - 8) Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, et al: Goblet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1168—1176, 1984.
 - 9) Ohkoshi K, Yamaguchi T, Ishii Y, et al: Histological study of keratoepithelioplasty in alkali-burned rabbit corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 (Suppl): 481, 1990.
 - 10) Kruse FE, Chen JJY, Tsai RJF, et al: Conjunctival transdifferentiation is due to incomplete removal of limbal basal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 30 (Suppl): 520, 1989.
 - 11) Thoft RA, Friend J, Murphy HS: Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits. I. The role of wounding. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 85—92, 1979.
 - 12) Kinoshita S, Friend J, Thoft RA: Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunctival to corneal epithelium in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1008—1014, 1983.
 - 13) 木下 茂, 切通 彰, 大路正人, 他: Palisades of Vogt の消失する角膜疾患. 臨眼 40: 363—366, 1986.
 - 14) Huang AJW, Tseng SCG: Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 96—105, 1991.
 - 15) Mun EC, Doctrow SR, Carter R: An angiogenesis inhibitor from the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 30 (Suppl): 151, 1989.
 - 16) Kinoshita S, Nagae Y, Kiritoshi A, et al: Angiogenesis is induced by in vivo rabbit conjunctival epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 32 (Suppl): 1162, 1991.
 - 17) Buck RC: Ultrastructure of conjunctival epithelium replacing corneal epithelium. Cur Eye Res 5: 149—159, 1986.
 - 18) Schermer A, Galvin S, Sun TT: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of epithelial stem cells. Cell Biology 103: 49—62, 1986.
 - 19) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al: Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. Cell 57: 201—209, 1989.
 - 20) Kinoshita S, Friend J, Thoft RA: Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 21: 434—441, 1981.