

三叉神経切断の家兎角膜上皮に及ぼす影響

荒木かおる, 木下 茂, 孫 乃学, 栗山 泰明, 大橋 裕一, 真鍋 禮三

大阪大学医学部眼科学教室

要 約

白色家兎 22 匹 (術後生存 16 匹) の三叉神経節後線維を外科的に切断し, 角膜上皮細胞に対する影響を検討した。角膜上皮の異常所見は三叉神経切断を受けた 13 眼 (81%) に認められた。内訳は, 角膜上皮混濁が 9 眼 (平均術後日数 5.6 日で発生), 角膜上皮欠損が 4 眼 (平均術後日数 5.8 日で発生) であった。組織学的検索では, 混濁例では上皮細胞層の層数の減少が認められ, 個々の上皮細胞が扁平化し, 細胞層の数も減少していた。角膜実質および内皮には異常を認めなかった。角膜全層に占める上皮厚さの比をイメージアナライザーで検討したところ, 神経切断眼では 3.8 ± 1.9 (%) , 対照眼では 6.5 ± 2.1 (%) であり, 神経切断眼の角膜上皮細胞層は有意に菲薄化していた ($p < 0.001$)。 (日眼会誌 96: 710—714, 1992)

キーワード: 三叉神経節, 角膜上皮, 神経切断, 栄養障害性潰瘍, 上皮菲薄化

Effect of Trigeminal Denervation on Rabbit Corneal Epithelium

Kaoru Araki, Sigeru Kinoshita, Naxue Sun, Yasuaki Kuwayama,
Yuichi Ohashi and Reizo Manabe*Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School*

Abstract

To investigate the effects of trigeminal denervation on the corneal epithelium, left postganglionic trigeminal neurotomy via intracranial approach was performed in 22 rabbits. Among 16 rabbits survived successfully, 13 denervated eyes (81%) showed corneal epithelial abnormalities that included 4 epithelial defects and 9 epithelial opacities. The remaining 3 eyes were normal. Histological examination showed many atrophic epithelial cells and the thinning of the corneal epithelial layer in the denervated eyes with corneal opacities. There was no abnormality in corneal stroma or endothelium. The ratio of epithelial to total corneal thickness calculated by a computer-assisted image analyzer was 6.5 ± 2.1 (%) in control eyes and 3.8 ± 1.9 (%) in the denervated eyes, the two values being significantly statistically different ($p < 0.001$). (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 710—714, 1992)

Key words: Trigeminal ganglion, Corneal epithelium, Denervation, Neurotrophic ulcer, Epithelial thinning

I 緒 言

外傷や頭蓋内手術で三叉神経が切断あるいは障害さ

れた場合, 同側角膜に遷延性上皮欠損や栄養障害性潰瘍が生じることが臨床的によく知られている。家兎を用いたこれまでの実験でも, 三叉神経切断側の角膜上

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島 1-1-50 大阪大学医学部眼科学教室 荒木かおる

(平成 3 年 10 月 31 日受付, 平成 4 年 1 月 23 日改訂受理)

Reprint requests to: Kaoru Araki, M. D. Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, 1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 533, Japan

(Received October 31, 1991 and accepted in revised form January 23, 1992)

皮に細胞分裂能の低下¹²⁾, glycolitic activity の減少³⁾, 上皮透過性の亢進や創傷治癒遅延⁴⁾, 細胞接着機構の減弱⁵⁾等が生じると報告されており, その機序として三叉神経が角膜上皮に対して neurotrophic な効果を持つことが推測されている。従って, 三叉神経と角膜上皮の関係をさらに詳細に検討することは栄養障害性潰瘍の原因解明と治療に役立つものと思われる。

さて三叉神経切断モデルとして, Mishima¹⁾は神経切断法を行っているが, Sigelman ら²⁾, Schimmelpfennig ら⁶⁾, Alper⁷⁾らは, 熱凝固を用いて作製しているため, 三叉神経節切断部位が視覚的に確認できず, 神経切断が不確実であった可能性がある。そこで今回, 我々は白色家兎を用いた経頭蓋法による三叉神経切断法をマイクロサージェリーとして確立し, その角膜上皮細胞に対する影響を再検討したので報告する。

II 方 法

1. 実験動物

2.0~3.5 kg の白色家兎 22 匹を使用し, いずれも以下の方法で左側の三叉神経節後線維を切断した。なお, 本動物実験は“動物の保護および管理に関する法律”に則して施行した。

2. 三叉神経切断法

白色家兎をウレタン静脈注射 (2 ml/kg) で麻酔したのち, 脳定位固定装置に固定し, 皮膚と骨膜を頭頂部で前後方向に約 4 cm 切開した。次に剥離子を用いて骨膜を剥離し, 顕微鏡下に頭頂部から左側頭部にかけて骨ドリルで約 25 mm×15 mm の骨窓を形成した。側頭骨と脳膜の間を剥離して脳底に到達し, 髄膜に被われた三叉神経節を確認したのち, 18 ゲージ針にて髄膜を切開した。三叉神経節を充分露出したのち, 神経節前半部を白内障手術用前囊穿刀を用いて直視下に完全に切断した。なお, 三叉神経切断に伴う同側瞳孔の一過性縮瞳によって神経切断を再確認した。皮膚を絹糸にて縫合し, 1 日 1 回の抗生物質静脈注射を術後 3 日間施行した。経頭蓋的三叉神経切断術を施行した 22 匹の白色家兎のうち, 術後感染症や脳挫傷による呼吸不全等の手術侵襲のため, 手術施行中あるいは手術 3 日後までに死亡したものは 6 匹 (約 27%) であった。従って実際の実験に使用した生存家兎は 16 匹 (73%) であった。この 16 匹には兎眼は認められず, 全身状態も良好であった。なお, 別に白色家兎 1 匹を用いて前述の方法で開頭し, 三叉神経を露出後, 切断術を施行し

なかったものを sham surgery とした。

3. 細隙燈顕微鏡による観察

手術施行後は, 連日細隙燈顕微鏡で結膜充血, 角膜上皮障害, 角膜実質浮腫の有無を観察した。

4. 組織学的検討

両眼球を摘出し, 10% 中性ホルマリンで固定したのちパラフィン包埋し, 5 μ m 厚の組織切片を作製し, ヘマトキシレン・エオジン染色を行った。眼球摘出時期は, 上皮欠損例や上皮混濁が生じた例においてはそれぞれが発生した時点, 細隙燈顕微鏡による観察で正常な場合には術後 7 日目とした。

5. イメージアナライザーによる角膜上皮厚さの検討

角膜上皮混濁を生じた 9 匹および細隙燈顕微鏡による観察において正常であった 3 匹について, その組織切片において, 角膜中央部の角膜直径の約 3 分の 1 長にあたる範囲を連続写真撮影して拡大し, 同部位の上皮部分の面積と角膜全層の面積を, イメージアナライザー (LA-555, ピアス社, 東京) を用いて測定した。この 2 つの面積を除算することによって, 角膜中央部の角膜上皮厚さと角膜全層厚さの比を算出し, 各眼ごとに連続切片の平均値を計算した。

III 結 果

1. 細隙燈顕微鏡による観察

16 匹のうち, 13 匹で神経切断側の角膜上皮の異常を認めた。4 匹 (25%) では角膜中央部やや上方より上皮欠損を生じ (術後平均日数 5.8 日で発生), 他の 9 匹 (56%) では同様の部にフルオレセインに非染色性の上皮混濁を認めた (術後平均日数 5.6 日に発生) (図 1)。3 匹 (19%) では, 術後 7 日間の観察期間中には,

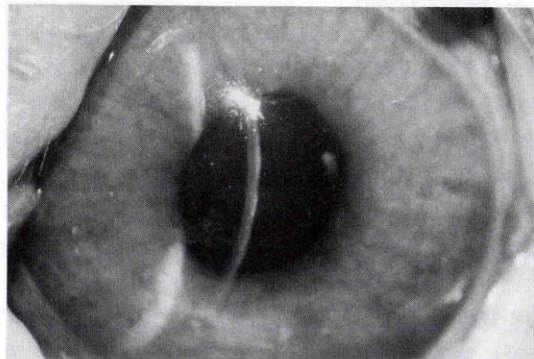


図 1 三叉神経切断眼に生じた角膜上皮混濁。角膜中央やや上部より混濁が観察される。

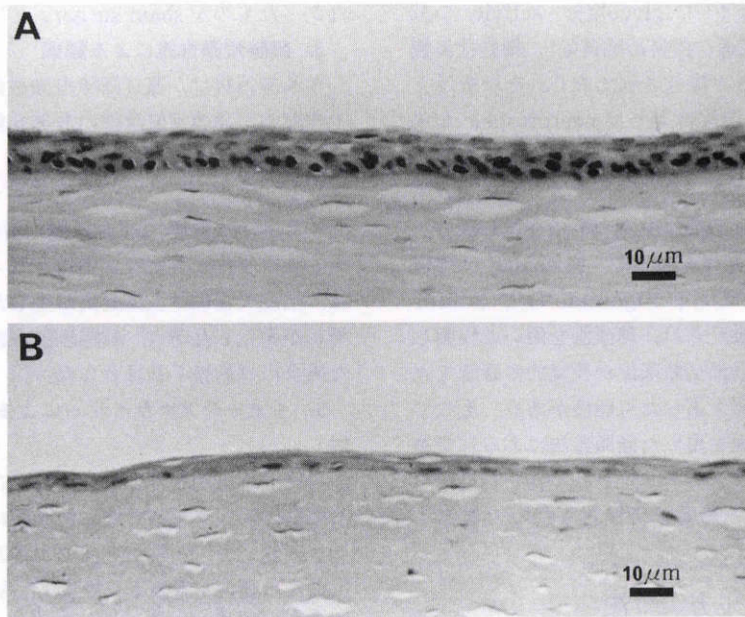


図2A 対照眼の角膜組織切片(HE, ×100). 2B 神経切断眼の角膜組織切片(HE, ×100). 神経切断眼では角膜上皮細胞の配列の乱れとともに上皮層の減少を認める. また, 対照眼に比して上皮の非薄化を認める.

細隙顕微鏡による観察において異常を認めなかった. 神経切断側の結膜には, 術直後から高度な充血と浮腫を認めた. これらの結膜変化は, 角膜上皮欠損を認めた4匹では持続したが, 上皮混濁例と細隙顕微鏡による観察で正常であった例では術後2~3日で鎮静化した. なお, 対照眼(右眼)にはこれらの変化は全く生じなかった. また, 角膜実質については, 上皮欠損例では実質浮腫を認めたが, その他の例では, 実質浮腫は認めなかった.

2. 組織学的検討

角膜混濁を認めた神経切断眼では, 角膜上皮の基底細胞とそれに続く翼状細胞は扁平化あるいは変形して規則的な配列を失っていた. 細胞核の萎縮も認められた. 最表層の細胞は高度に扁平化し, 所々脱落, 剥離していた. この最表層の細胞から基底膜直上の細胞に到る細胞の層は全体で2~3層であり, 角膜上皮細胞層は非薄化していた(図2). 角膜実質および内皮細胞には炎症所見, 浮腫, 瘢痕等は認めなかった. 上皮欠損を認めた例では, 欠損部にあたる部位は上皮細胞が完全に脱落しており, 角膜周辺部でも, 一部では表層の上皮細胞が脱落していた. 細隙顕微鏡による観察で正常であった例では, 組織学的には各々の細胞に大

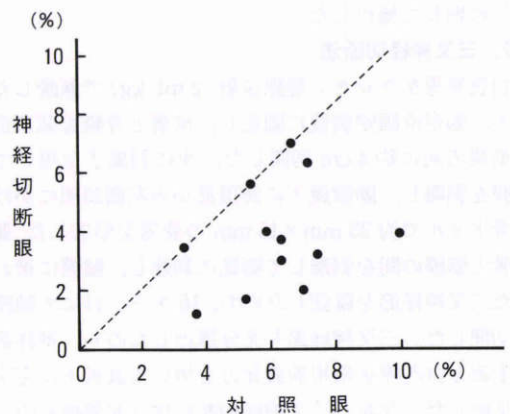


図3 角膜全層の厚さと上皮の厚さ比.

縦軸は各家兎の神経切断角膜における角膜全層に対する上皮層の厚さ比を示し, 横軸は各々の対照眼における角膜全層に対する上皮層の厚さ比を表す. plotした点がすべて点線より下方, あるいは点線上にあることから神経切断眼では対照眼に比して上皮厚/角膜厚が減少していることがわかる.

きな変化は認めなかった. なお, sham surgery を施行した例の角膜では, 組織学的に炎症所見などの異常は認めなかった.

3. 角膜上皮厚さの検討

角膜全体の厚さに占める上皮の厚さ比は、神経切断眼では 3.8 ± 1.9 (%), 対照眼では 6.5 ± 2.1 (%)であり、神経切断眼の角膜上皮は統計学的に有意に菲薄化していた($P < 0.001$) (図3)。図3で示した直線上の3点、すなわち角膜全体の厚さに占める上皮の厚さ比において神経切断眼と対照眼に差のなかった3例は、臨床的にまた組織的に異常を認めなかった3例と一致していた。

IV 考 按

今回の実験により、三叉神経を切断すると、同側角膜上皮に欠損あるいは混濁を生じることが再確認された。三叉神経切断眼に角膜上皮欠損が生じることについては、Sigelman^ら²⁾、Alper⁷⁾らも家兎を用いた実験で報告しているが、角膜上皮欠損の出現頻度および角膜上皮の菲薄化について、数値化し統計学的に有意であることを明らかにしたのは、今回が初めてである。また、これまでの報告のうちSigelman^ら²⁾の報告した角膜混濁は術後24時間に生じた角膜実質の化膿性浸潤であり、上皮細胞には異常を認めなかったとしており、今回観察されたものとは異なるもののようである。今回観察された上皮混濁は、組織切片における上皮菲薄部位と一致すること、実質には細胞浸潤や浮腫を認めなかったことから、上皮細胞層そのものの変化が主体となったものであると考えられる。すなわち、本来5~6層である上皮細胞層が2~3層に減少し、各々の細胞が扁平化や萎縮したことにより、角膜上皮の透明性を維持する細胞配列が乱れ混濁を生じたと推測される。さらに予備実験から、上皮混濁を生じた例は数日後に上皮欠損へと進行するという印象があるため、今回観察された上皮欠損と上皮混濁は同一機序で生じたものと想像される。三叉神経切断術を施行した16例中3例は組織学的に異常を認めなかった。これについては観察が7日間と短期間であったことや家兎の個体差も関係している可能性があるが、より微細な変化の有無は電子顕微鏡的に検討する必要があると思われる。なお今回、イメージアナライザーを用いて角膜上皮層と角膜全層の面積を求めて、角膜上皮菲薄化を統計学的に明らかにしたが、この方法は角膜の全体像をより反映することになり、菲薄化を示すのに有効な方法と考えられた。

三叉神経切断後にこのような角膜上皮細胞の菲薄化が生じる原因として、角膜上皮細胞の分裂能の低下に

よる菲薄化、あるいは細胞間接着機構の異常による角膜上皮細胞の脱落亢進が考えられる。Mishima¹⁾は mitotic index を用いて術後4日目までの三叉神経切断眼に角膜上皮分裂能の低下が認められたことを報告しているが、考按の中でこの結果には交感神経系を含めた全身的な反応が影響している可能性があり、三叉神経単独の作用を解明するには、実験系に困難さがあることを指摘している。また、Cavanagh^ら⁸⁾も三叉神経切断眼では角膜上皮細胞内へのコリン取り込みの減少すなわち細胞内アセチルコリンの減少が生じ、これが角膜上皮細胞の分裂能低下と関係しているかもしれないとの推測をしている。しかし、実際に三叉神経切断眼におけるアセチルコリンの取り込みを測定していないため、不確実な推論である。したがって、三叉神経切断後の角膜上皮に分裂能の低下があるか否かについては、さらに検討を重ねる必要がある。もし、角膜上皮細胞の分裂能に差が認められず、上皮細胞層が菲薄化するとすれば、角膜表層細胞の脱落の促進、接着能の低下等が生じている可能性が高い。Sugiura^ら⁹⁾¹⁰⁾は、三叉神経切断眼における角膜上皮を電子顕微鏡で観察したところ、基底細胞の tonofilament の減少、細胞間隙の拡大、基底細胞や翼状細胞間の嵌合の減少、そして基底細胞核の円形化傾向が見られたと報告している。したがって、三叉神経切断により、細胞間に存在するデスモゾームや細胞基質間のヘミデスモゾームあるいは focal contact 部に存在する各種蛋白の合成阻害が生じ、角膜上皮細胞が早期に脱落し、菲薄化や欠損が生じる可能性があると考えられる。また、神経麻痺性角膜炎に対してフィブロネクチン点眼が奏効することから、フィブロネクチンの合成が阻害されている可能性もある。

さらに、角膜上皮混濁が上記のような角膜上皮細胞自体の異常ではなく、涙液異常による二次的な変化である可能性も考えられる。すなわち、三叉神経切断により、その支配をうけている涙腺が何らかの影響を受け涙液量や涙液成分に変化が生じる可能性、瞬目反射が障害され涙液交換が円滑に行われない可能性、角膜知覚鈍麻により外界刺激に対して無防備となる可能性などである。涙液分泌は一般に大錐体神経由来の副交感神経による支配を受けており、三叉神経切断で涙液減少は認めなかったとの報告や⁶⁾、神経切断3時間後に角膜の乾燥が著明であったという報告¹⁾、眼瞼縫合にて乾燥を防止すると角膜上皮異常が予防できるという報告¹¹⁾などがあり、三叉神経切断における涙液量の

変化に関してはいまだ一致した見解はない。ただし、今回生じた上皮混濁は、角膜中央部に局限していることやフルオレスセインに非染色性であることから、いわゆる涙液減少による角膜炎とは異なっていると考えられる。したがって、涙液の変化による間接的な原因も関与しているかもしれないが、やはり角膜上皮細胞自体の異常が角膜上皮混濁の主な原因であると推察できる。

神経切断により角膜上皮自体に異常が生じる機序としては、三叉神経節から角膜上皮に対して何らかの neurotrophic factor を分泌しているためと推測されている。運動神経においては、神経がその効果器に対して neurotrophic factor を分泌している可能性は示唆されている¹²⁾¹³⁾が、知覚神経にも同様の作用が存在するかどうかは現在のところ明らかでない。しかし、知覚神経である三叉神経節に神経ペプチドが伝達物質として存在し、刺激に応じて末梢へ分泌され、少なくとも有痛刺激による眼内炎症の発症に関与していることが明らかになっている¹⁴⁾。三叉神経節由来の角膜上皮細胞に対する neurotrophic factor が存在するかどうか、また、今回の現象がその neurotrophic factor の欠如と直接関係しているかについても今後解明する必要があると考えられる。

文 献

- 1) **Mishima S**: The effect of the denervation and stimulation of the sympathetic and the trigeminal nerve on the mitotic rate of the corneal epithelium in the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 1: 65—73, 1957.
- 2) **Sigelman S, Friedenwald JS**: Mitotic and wound-healing of the activities of the corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 52: 46—57, 1954.
- 3) **Simone S**: Ricerche sulla fosfatasi alcalina della cornea di coniglio in condizioni di cheratite neuroparalitica sperimentale. *Arch Ophthalmol Copenhagen*, 62: 77—82, 1958.
- 4) **Beuerman RW, Schimmelpfennig B**: Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurology* 69: 196—201, 1980.
- 5) **Beuerman RW, Schimmelpfennig B, Burstein N**: Anatomy of the denervated corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 126, 1979.
- 6) **Schimmelpfennig B, Beuerman RW**: A technique for controlled sensory denervation of the rabbit cornea. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 218: 287—293, 1982.
- 7) **Alper MG**: The anesthetic eye: An investigation of changes in the anterior ocular segment of the monkey caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course. *Trans Am Ophthalmol* 72: 323—365, 1976.
- 8) **Cavanagh HD, Colly AM**: The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmologica* 67(Suppl 192): 115—134, 1989.
- 9) **Sugiura S, Matsuda H**: Electron microscopic observations on the corneal epithelium after sensory denervation. *Jpn J Ophthalmol* 11: 207—212, 1967.
- 10) 杉浦清治, 松田英彦: 三叉神経切断による角膜上皮細胞の変化について. *日眼会誌* 71: 1123—1137, 1967.
- 11) **Snellen H**: Experimental-Untersuchungen über den Einfluss der Nerven auf den Entzündungsprozess. *Arch Holl Beitr Z Natur- und Heik* 1: 206—217, 1857.
- 12) **Aguilar CE, Bisby MA, Diamond J**: Impulses and the transfer of trophic factors in nerves. *J Physiol* 226: 60—61, 1972.
- 13) **Oh TH, Markelonis GJ**: A protein fraction from peripheral nerve having neurotrophic effects on skeletal muscle cells in culture. *Exp Neurology* 58: 285—295, 1978.
- 14) **Stjernschantz J, Sears M, Stjernshantz L**: Intraocular effects of substance P in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 53—60, 1981.