

ヒト角膜内皮細胞の病的状態における代謝

島崎 潤¹⁾²⁾⁴⁾, Ronald A. Laing²⁾, 坪田 一男²⁾³⁾⁴⁾, Kenneth R. Kenyon⁴⁾¹⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾ボストン大学医学部眼科学教室, ³⁾東京歯科大学眼科学教室⁴⁾Eye Research Institute of Retina Foundation, and Massachusetts Eye & Ear Infirmary

要 約

全層角膜移植施行時に得られたレシピエント角膜の内皮細胞の代謝状態を、レドックスフルオロメトリーを用いて測定し、病理組織学的所見との関連について検討した。種々の程度の内皮細胞障害を示すレシピエント角膜 42 眼とドナー角膜 4 眼の計 46 眼について、内皮細胞側よりの還元型ビリジンヌクレオチド (PN) と酸化型フラボプロテイン (Fp) の自己蛍光を測定し、その比 (PN/Fp 比) を代謝状態の指標とした。正常角膜に比して、軽度障害された内皮細胞は、より還元状態にあり (高 PN/Fp 比)、逆に高度に障害された内皮細胞は、より酸化された状態 (低 PN/Fp 比) にあった。PN, Fp 各シグナルの増減より、内皮細胞は、軽度障害された状態では、解糖系などの代謝状態が活発となっており、障害が進行するにしたがって代謝が不活発になっていることが推測された。レドックスフルオロメトリーは、ヒト角膜内皮細胞の代謝を非侵襲的に測定するのに有用であることが示唆された。(日眼会誌 96: 828-833, 1992)

キーワード: レドックスフルオロメトリー, 角膜内皮細胞, 病理組織学, ビリジンヌクレオチド, ミトコンドリア

Metabolic Analysis of the Diseased Human Corneal Endothelium

Jun Shimazaki¹⁾²⁾⁴⁾, Ronald A. Laing²⁾, Kazuo Tsubota²⁾³⁾⁴⁾ and Kenneth R. Kenyon⁴⁾Departments of Ophthalmology, ¹⁾Keio University School of Medicine, ²⁾Boston University School of Medicine,³⁾Tokyo Dental College, ⁴⁾Eye Research Institute of Retina Foundation, and Massachusetts Eye & Ear Infirmary

Abstract

Redox states of the corneal endothelium in 42 recipient corneas obtained at the penetrating keratoplasty were measured non-invasively using ocular redox fluorometry. Autofluorescence from reduced pyridine nucleotides (PN) and oxidized flavoproteins (Fp) were measured, and the PN/Fp ratio was used as an indicator of the redox state. Endothelial damage was graded as normal, mildly damaged, moderately damaged, and severely damaged, based on the histopathological findings. Mildly damaged endothelium showed a significantly higher PN/Fp ratio than the that in normal endothelium whereas the ratio was significantly lower in the severely damaged endothelium. These changes in the redox state may represent compensation and decompensation processes of the endothelial metabolism. Ocular redox fluorometry was shown to be useful for the evaluation of the metabolic state in the human corneal endothelium. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 828-833, 1992)

Key words: Redox fluorometry, Corneal endothelium, Histopathology, Pyridine nucleotides, Mitochondria

別刷請求先: 160 新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 島崎 潤
(平成 3 年 10 月 31 日受付, 平成 4 年 2 月 17 日改訂受理)

Reprint requests to: Jun Shimazaki, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinano-Machi, Shinjuku-ku 160, Japan

(Received October 31, 1991 and accepted in revised form February 17, 1992)

I 緒 言

角膜内皮細胞の検査法としてスペキュラーマイクロスコープが登場して以来、内皮細胞の形態変化と、その機能が関連することが示されてきた¹⁾。しかし先に我々は、遺伝性糖尿病マウスにおいて、角膜内皮細胞に形態変化が生じていない時点でその代謝状態に変化が生じている事を報告した²⁾。フックス角膜変性症や水疱性角膜症においても、内皮細胞の代謝状態がその形態変化に先んじてよりダイナミックに変化することが示されており³⁾⁴⁾、その変化を捕らえることができれば、より鋭敏な組織の評価法となりうると期待される。

角膜内皮の代謝状態を知る手段としては、生化学的解析や免疫組織学的手法、nuclear magnetic resonance (NMR) などが試みられているが、前2者は組織を採取する必要があるため臨床には応用できない。NMRは、組織を破壊せずに、代謝状態を知ることができ、感度も鋭敏でドナー角膜の評価法としての有用性も示されている⁵⁾が、器械が高価で操作が難しく、かつ現在の機種では6~8個の角膜が1回の測定に必要であるという欠点がある。

レドックスフルオロメトリーは、フルオロメトリーとスペキュラーマイクロスコープとを組み合わせ、組織の一定部分からの蛍光量を測定することにより代謝状態を知る方法である^{2)6)~12)}。通常は還元型ピリジンスクレオチド(PN)と酸化型フラボプロテイン(Fp)よりの自己蛍光を測定することにより、組織の酸化還元状態を測定する。本方法は非侵襲的な測定法で、かつごく薄い組織の代謝状態を知ることができるため、角膜内皮細胞の評価に適していると考えられている^{2)6)~8)10)11)}。今回我々は、全層角膜移植の際に得られたレシピエント角膜を材料に、その角膜内皮細胞の酸化還元状態を測定し、病理組織学的所見との関連について検討したので報告する。

II 実験方法

1. 材料

材料は、Massachusetts Eye & Ear Infirmaryにおいて全層角膜移植施行時に摘出された42片のレシピエント角膜と4片のドナー角膜の計46角膜片である。角膜は摘出後、ただちにMcCarey-Kaufman mediumに入れられ、測定時まで4℃で保存し、24時間以内にレドックスフルオロメトリーによる測定を行った。対象となったレシピエントの性別は、男性21例、女性21

例で、年齢は、25歳から90歳、平均66.1歳であった。正常対照として、アイバンクより得られた4眼(男性3例、女性1例、年齢1~77歳、平均41.8歳)の移植手術に適しないドナー角膜を同様に測定した。

2. 方法

1) レドックスフルオロメトリー

レドックスフルオロメトリーは、スペキュラーマイクロスコープと同じ光学系を持ち、その入射光側と反射光側にバンドパスフィルターを置き、検出系としてフォトマルチプライヤーを使用したフルオロメトリーである^{2)6)~12)}。本装置の測定範囲は、今回用いた条件下では垂直方向で約15μm、水平方向で約150×10μmであった。一平面における各シグナルの測定時間は約1秒であり、これを30回を1クルールとして3~5回測定し、その平均値を代表値としてとった。今回の研究では以前の報告⁸⁾¹⁰⁾と同様、内皮側を上にしてアイバンク用の合成樹脂容器内に保存液と共に入れた角膜片をレドックスフルオロメーター下におき、室温にて測定した。透明な角膜においては上皮側からの測定も可能であったが、角膜片を固定することが難しく、かつ角膜実質の浮腫の強いものでは内皮細胞に焦点を合わせることが困難であるため、内皮側より測定を行った。

46片の角膜のうち、前半の30の角膜片(レシピエント角膜26片とドナー角膜4片)においては内皮細胞にスペキュラーマイクロスコープの焦点を合わせた状態でPNとFpよりの蛍光強度を測定した。この方法は簡便で測定時間も短くて済むが、高度に浮腫状となった角膜片においては、実質よりの反射光の影響を受けるため測定値にばらつきが生じやすかった。このため実験後半の16片のレシピエント角膜片を用いた実験においては、角膜片を乗せた台を5μmずつ上昇させ、各々の位置で測定して全体として蛍光強度のプロフィールを作り、角膜内皮細胞よりのシグナルを、実質よりのシグナルの影響を差し引いた上で求めた。組織の酸化還元状態の指標としてはPNシグナルとFpシグナルの比(PN/Fp比)を用いた。2種類の測定法では、PNとFpの各々の値は異なることはあっても、PN/Fp比には殆ど差を認めず、そのためにこの両方で得られた結果を合せて検討した。

2) 病理組織学的検査

レドックスフルオロメトリーによる測定の後、32のレシピエント角膜片は、2.5%のグルタルアルデヒドと2%のホルムアルデヒドを0.1M カコジル酸緩衝液に混和させたカルノフスキーの固定液で固定され

表1 角膜内皮細胞の障害程度分類

内皮細胞の状態	細胞の拡大	細胞表面の変化	細胞間結合の変化	デスメ膜の露出
正常	—	—	—	—
軽度異常	+	+	±	—
中等度異常	+	++	+	+
高度異常	++	++	++	++

表2 原疾患と疾患別の内皮細胞障害程度

原疾患	例数	病理学的検討 施行例数	病理学的状態			
			正常	軽度	中等度	高度
水疱性角膜症	23	16	0	1	8	7
偽水晶体性	17	4	0	1	8	7
無水晶体性						
その他						
フックス変性症	8	6	0	2	4	0
再移植	4	4	0	1	1	2
円錐角膜	4	4	3	0	1	0
角膜実質炎	2	2	0	2	0	0
角膜変性症	1	0	0	0	0	0
ドナー角膜	4	4	4	0	0	0
計	46	36	7	6	14	9

た。その後角膜片は半割され、一片は蒸留水にて洗浄後、12時間乾燥させ、60℃で3時間さらに乾燥、その後60%の金と40%のパラジウムの混合物によりコーティングを行い、AMR 1000型走査型電子顕微鏡により内皮面を観察した。もう一片は、透過型電子顕微鏡検査のため2%四酸化オスミウムにて固定し、アルコールにて脱水後、エポニーアラルダイトに包埋した。その後酢酸ウランとクエン酸鉛にて二重染色し、Philips 410電子顕微鏡にて観察した。

3) 角膜内皮細胞の病理学的分類

角膜内皮細胞の障害の程度は、主として走査型電子顕微鏡の所見に基づいて正常群・軽度障害群・中等度障害群・高度障害群、の4群に分類された。分類の基準を表1に示す。判定は、3人の判定者が独立して、患者についての情報を知らされない形で行った。

III 結 果

1. 疾患別の角膜内皮所見

表2に、角膜移植の原疾患と角膜内皮細胞の障害程度の関係を示す。円錐角膜と角膜実質炎後の角膜白斑の内皮細胞はおおむね障害の程度が軽度であった。水疱性角膜症・フックス角膜変性症の内皮細胞は多くの場合中程度～高度の障害を示していたが、中には比較

的障害程度の軽度の例も存在した。

図1に各々の障害程度を示す内皮細胞の典型的病理組織像を示す。軽度障害群では、透過型電子顕微鏡においてミトコンドリアを始めとする細胞内小器官が多数存在する所見が得られ、活発な代謝状態にあるものと思われた(図1C)。一方、中等度障害群では細胞内小器官はむしろ減少しており、細胞は扁平化し、空胞化などの変性所見が散見された。高度障害群では内皮細胞は脱落するかあるいは高度に扁平化し、透過型電子顕微鏡で観察することは困難であった(図1D～F)。

2. 病理学的所見とレドックスフルオロメトリー

図2に角膜内皮細胞の障害程度とレドックスフルオロメトリーによって得られたPN/Fp比の関係を示す。PN/Fp比は正常群に比して、軽度障害群においては有意に増加していたが、障害の程度が高度となるにつれて逆に減少し、高度障害群では正常群より有意に減少していた。PNシグナル・Fpシグナルの各々の変化を検討してみると、軽度障害群のPN/Fp比の増加は主としてPNシグナルの増加によっており、高度障害群の減少は主としてFpシグナルの増加によっていることが分った(図3)。

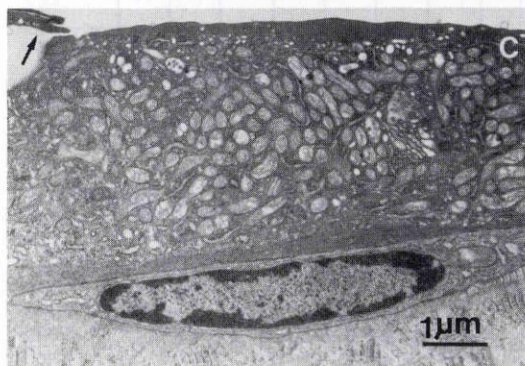
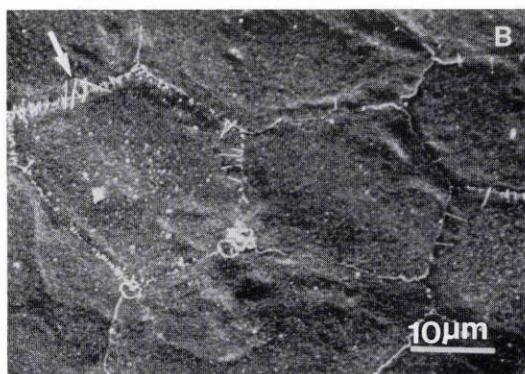
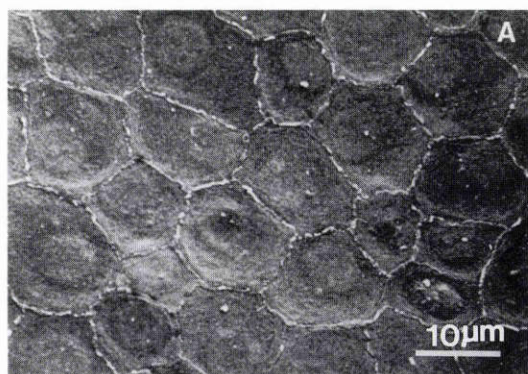


図1A 正常角膜内皮細胞の走査電子顕微鏡像。
円錐角膜の症例で、多少の大小不同はあるが、細胞面積・細胞間接合部は正常に保たれている(×2,000)。

図1B 軽度障害例の内皮細胞の走査電子顕微鏡像。
角膜実質炎の症例で、細胞は拡大し、糸状の細胞質突起(filopodia)が細胞間にみられる(矢印)(×2,000)。

図1C 軽度障害例の内皮細胞の透過型電子顕微鏡像。
多数のミトコンドリアなどの細胞質内小器官がみられ、一部で内皮細胞の重層化も認められる。細胞質突起が、隣接する細胞から伸びている(矢印)(×15,000)。

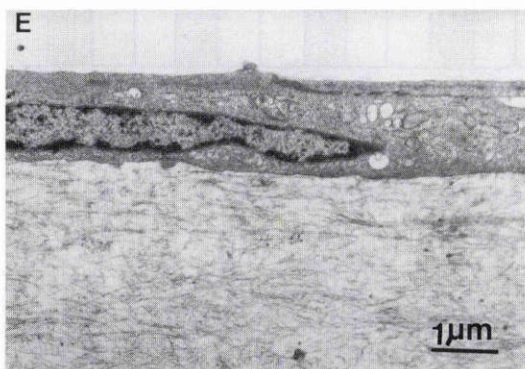
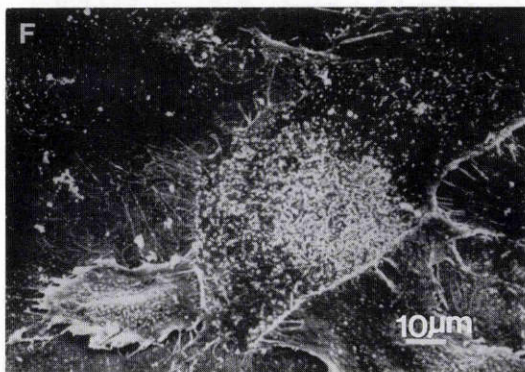


図1D 中程度障害例の走査型電子顕微鏡像。
無水晶体性水疱性角膜症の例で、細胞は拡大し、一部で著明な細胞質突起の延長・デスメ膜の露出が認められる(矢印)(×1,000)。

図1E 中程度障害例の透過電子顕微鏡像。
細胞は菲薄化し、細胞質内小器官は減少している(×2,000)。

図1F 高度障害例の走査型電子顕微鏡像。
偽水晶体性水疱性角膜症の例で、細胞は著明に拡大・菲薄化し、デスメ膜が露出している(×15,000)。



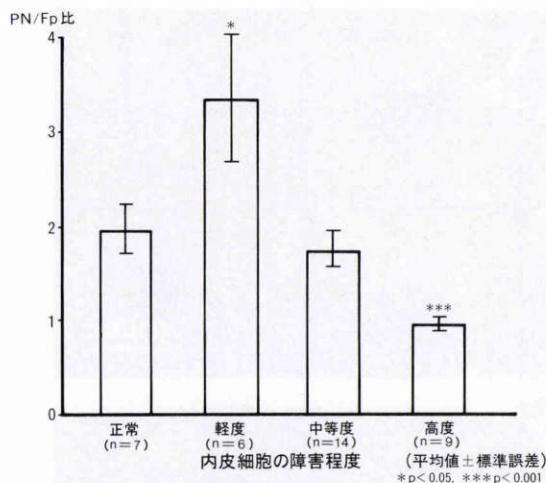


図2 内皮細胞の障害程度と PN/Fp 比.

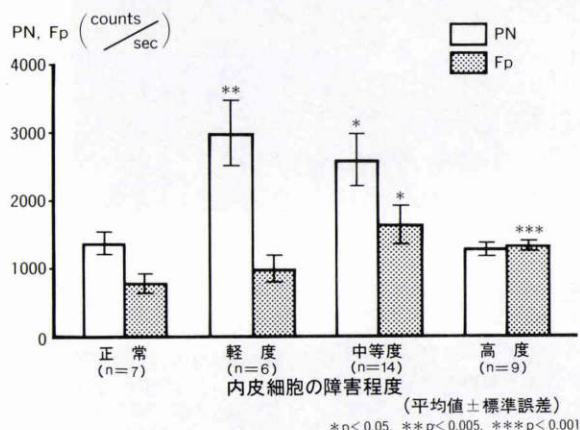


図3 内皮細胞の障害程度と PN, Fp シグナル.

IV 考 按

組織の酸化還元状態は、角膜内皮細胞のように代謝の盛んな組織においては、ミトコンドリアの代謝状態を主として反映するとされている¹¹⁾。ミトコンドリアの酸化還元状態は、①組織酸素量、②反応基質量、③組織の代謝活性の3つの因子によって規定される¹¹⁾¹³⁾。今回の条件下においては、酸素の供給量には変化がないと考えられるので、酸化還元状態の変化は、糖質代謝などによる基質(NADH)の産生量と、ATPの消費量によって表される代謝活性のバランスによって規定されていると考えられる(図4)。これに基づいて今回の結果に考察を加えると、内皮細胞に軽度のストレスがかかった状態では、解糖系を始めとする種々の代謝経路が活性化され、ミトコンドリアに到達する

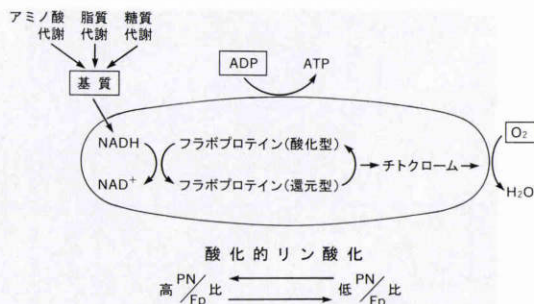


図4 ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化と、酸化還元状態を規定する要素(□)を示す。リン酸化の反応が停滞するほど PN/Fp 比は高くなり、反応が活発なほど PN/Fp 比は低くなる。

NADH 量は増加する。レドックスフルオロメトリーにおける PN シグナルの値が組織のビリジンスクレオチド量と相関することは以前に示されており¹²⁾、軽度障害群における PN シグナルの上昇は、このプロセスを反映していると考えられる。内皮細胞の障害が進行すると、細胞自身の活性が低下し、代謝反応物の量も減少し、これにより酸化還元状態は酸化方向に移動、すなわち PN/Fp 比の低下を示す。高 PN/Fp 比の症例では組織学的に多くのミトコンドリアが観察され、障害が進行するにしたがってその数が減少したことはこのことを裏付けているものと考えられる。

角膜内皮の代謝状態が病的状態で変化し、かつそれが病気の進行と共に変化することは、水疱性角膜症やフックス変性症において報告されている。Tuberville ら³⁾は、ミトコンドリア呼吸鎖の重要な酵素である cytochrome oxidase の角膜内皮における活性を組織化学的手法を用いて測定し、フックス変性症においては、中央の角膜浮腫の部分では活性が低下し、その周囲においては逆に上昇している事を報告した。彼ら⁴⁾は同様の手法で、水疱性角膜症においても検討し、同疾患ではフックス変性症で見られるような部位における活性の差はなく、全体的に活性が減少していたとした。また、Geroski ら¹⁴⁾は Na/K ATPase の pump site density を測定し、guttata のある角膜では正常に比して有意に density が増加していることを報告した。McCartney ら¹⁵⁾は、同様に Na/K ATPase density が、水疱性角膜症や角膜浮腫をともなったフックス変性症で有意に減少していることを報告した。これらの報告は、手法こそ異なれいづれも角膜内皮細胞の代謝活性が、障害が加わり、それを代償しようとしている

時期には上昇し、その後機能が衰えるとともに減少していくことを示している。今回観察されたPN/Fp比の変化も同様に推移しており、かつ病理学的所見と関連していたことは、レドックスフルオロメトリーによる測定が組織のviabilityの評価法として有用である可能性を示唆しているものと考えられた。

いくつかの例において病理組織学的所見とレドックスフルオロメトリーの結果が相関しない結果が得られた。この原因としては、病的角膜における内皮細胞の状態が、部位によって大きく異なる例のあることがあげられる。低倍率の走査型電子顕微鏡での観察で明らかであったように、特に中等度に障害された角膜では、一部では比較的健常な内皮細胞が残存しているのに、他の部位ではデスメ膜が露出するほどの障害を呈している、といった例がしばしば存在した。代謝状態の測定は角膜中央部で施行したので、病理組織学的判定も角膜中央部の所見を基に判定したが、レドックスフルオロメトリーは、20~30個の内皮細胞よりのシグナルを測定しているので、走査型電子顕微鏡所見と差が出る可能性は充分に考えられた。測定値の標準偏差が、高度障害群においては非常に小さいことは、このような推測を間接的に裏付けるものと考えられる。

角膜内皮細胞のviabilityを非侵襲的に測定することが可能となれば、眼球銀行におけるドナー角膜の評価、コンタクトレンズの影響、成長因子などの薬理作用の評価、など数多くの応用が期待される。本報告は、ヒト角膜内皮細胞の酸化還元状態を非侵襲的に測定した初めての報告であり、今後臨床応用を目標にさらに検討を加えたいと考えている。

本稿の要旨は、第93回日本眼科学会総会で報告した、ご校閲いただいた小口芳久教授に深謝致します。なお、本研究の病理組織学的検討において、多大の貢献をされたLaila A. Hanninen 女史に深謝致します。

文 献

- 1) Neubauer L, Laing RA, Leibowitz HM: Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short-term storage. Arch Ophthalmol 102: 439—444, 1984.
- 2) 島崎 潤, 坪田一男, 服部正和, 他: 糖尿病における角膜・水晶体代謝の非侵襲的測定: 生体眼での測定. 日眼会誌 96: 119—124, 1992.
- 3) Tuberville AW, Wood TO, McLaughlin BJ: Cytochrome oxidase activity of Fuchs' endothelial dystrophy. Curr Eye Res 5: 939—947, 1986.
- 4) Tuberville AW, Wood TO, McLaughlin BJ: Cytochrome oxidase activity of postsurgical bullous keratopathy endothelium. Curr Eye Res 6: 1057—1063, 1987.
- 5) Greiner JV, Lass JH, Glonek T: Ex vivo metabolic analysis of eye bank corneas using phosphorus nuclear magnetic resonance. Arch Ophthalmol 102: 1171—1173, 1984.
- 6) Laing RA, Fischbarg J, Chance B: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide fluorescence from the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 96—102, 1980.
- 7) Tsubota K, Laing RA, Chiba K, et al: Noninvasive metabolic analysis of preserved rabbit cornea. Arch Ophthalmol 106: 1713—1717, 1988.
- 8) 坪田一男, 千葉桂三, Laing RA, 他: レドックスフルオロメーターによる保存角膜の糖代謝の検討. 日眼会誌 92: 1321—1326, 1988.
- 9) 坪田一男, Laing RA: 角膜上皮の糖代謝におけるオキシレーションの存在と代謝阻害剤の及ぼす影響. 日眼会誌 92: 959—962, 1988.
- 10) Tsubota K, Laing RA, Chiba K, et al: Noninvasive metabolic analysis of preserved rabbit cornea. Arch Ophthalmol 106: 1713—1717, 1988.
- 11) Masters BR: Noninvasive corneal redox fluorometry, in Zadunaisky JA, Davson H (eds): Current Topics in Eye Research (Vol 4), Orlando, Academic Press, 139—200, 1984.
- 12) Shimazaki J, Tornheim K, Laing RA: Correlation of redox fluorometry and analytical measurements of pyridine nucleotide. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2274—2278, 1989.
- 13) Chance B, Williams GR: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: III. The steady state. J Biol Chem 217: 409—427, 1955.
- 14) Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, et al: Pump function of the human corneal endothelium: Effects of age and cornea guttata. Ophthalmology 92: 759—763, 1985.
- 15) McCartney MD, Robertson DP, Wood TO, et al: ATPase pump site density in human dysfunctional corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1955—1962, 1987.