

シクロスポリン点眼の角膜移植への応用

秋山 修一, 横山 利幸, 高野 俊之, 小林 千博, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

臨床応用に有効なシクロスポリン(CYA)点眼濃度を検討する目的で, 実験1, 30匹の白色家兎の右眼に交換角膜移植を施行. I群10匹は0.025%CYA点眼, II群10匹は0.05%CYA点眼, III群10匹は対照として基剤点眼を各々術後より1日4回, 50日間投与し100日間観察した. 術後14日目に抜糸と感作を強める目的で交換皮膚移植を追加した. 術後50日目の透明維持率は, I群40%, II群80%, III群20%で0.05%CYA点眼群が有意に高い透明維持率を得た. 実験2, 白色家兎16匹にウイスターラット8匹の角膜を移植する異種表層角膜移植を施行し, I群8匹に0.05%CYA点眼1日4回50日間投与, II群8匹は対照として何も点眼せずに100日間経過観察した. 50日目の透明治癒率はI群71.4%, II群12.5%と0.05%CYA点眼群が有意に高い透明維持率を得た. 以上より臨床応用には0.05%CYA点眼が有効であると思われた. (日眼会誌 97: 378-382, 1993)

キーワード: シクロスポリン, 角膜移植, 免疫抑制剤

Application of Cyclosporin for Cornea Graft

Syuichi Akiyama, Toshiyuki Yokoyama, Toshiyuki Takano,
Chihiro Kobayashi and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

This study aimed to determine the optimal concentration rate of clinically effective Cyclosporin (CYA). Exchange penetrating keratoplasties were performed on 30 albino rabbits divided into 3 groups of ten, Groups I, II, and III, using 7 mm. trephine. In Group I 0.025% CYA drops were administered 4 times per day for 50 days and similarly 0.05% CYA drops were given in Group II. Only the solvent (alpha cyclodextrin), without any CYA, was applied to Group III, the control group, in the same manner. Suture removal and skin grafting were carried out on the 14th day after operation, as an additional means of sensitization. The 50-day post-operative rate of transparency retention was 40% for Group I, and 80% for Group II, and 20% for Group III, indicating that 0.05% CYA concentration was the most effective. In Experiment II, hetero-lamellar keratoplasties were performed on 16 albino rabbits to 8 Wistar rats, divided into Groups I and II. CYA (0.05% concentration) was applied 4 times a day for 50 days in Group I. Group II, the control group, was not treated. Both groups were followed for 100 days post operation. The 50-day post-operative rate of transparency retention of Group I was 71.4% and 12.5% for Group II. These figures also confirmed the effectiveness of 0.05% CYA. The results of our two experiments demonstrate that the application of 0.05% CYA would be most effective clinically. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 378-382, 1993)

Key words: Cyclosporin, Keratoplasty, Immunosuppressants

別刷請求先: 113 文京区本郷3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 秋山 修一

(平成4年3月31日受付, 平成4年8月24日改訂受理)

Reprint requests to: Syuichi Akiyama, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

(Received March 31, 1992 and accepted in revised form August 24, 1992)

I 緒 言

シクロスポリン (CYA) は1970年代中頃、ノルウエーの高原で発見された *Tolypocladium inflatum* Gams より抽出されたサイクリックポリペプチドである。その免疫抑制効果は著しく、従来50%であった腎移植の1年生着率が80%を上回り、25%~40%であった肝移植患者の1年生着率が、80%に向上している^{1)~3)}。眼科領域においても角膜移植時の拒絶反応⁴⁾や、自己免疫疾患に起因する各種眼症状⁵⁾に対しても有効性が示唆されている。しかし一方で全身投与における通常用量でも腎・肝機能障害などの副作用^{1)~3)}が報告されていることから、眼科領域での点眼剤による有効性が期待されていた。ところがシクロスポリンは、水に溶けにくいいため、1980年 Shepherd ら⁶⁾がシクロスポリンをオリーブ油やヒマシ油に溶解した点眼剤での免疫抑制効果の報告があるが、油性の場合シクロスポリンの角膜実質組織への移行が悪く、刺激症状が強いといった欠点があった。そこで金井ら⁶⁾は、各種溶解剤を用いてシクロスポリンの角膜透過性について検討し、alpha cyclodextrin (以下 α -CD) で溶解した CYA 点眼が低濃度かつ今までの報告よりも角膜透過性のよいことを報告した。今回我々は、CYA 点眼の臨床応用に当たり、より条件の悪い host 角膜を想定し、皮膚移植にて感作を増強した角膜交換移植実験と家兎-ラット間の異種角膜移植実験を施行し、0.025% CYA 点眼、0.05% CYA 点眼の有効性を比較した。また、過去の実験とも比較し臨床応用に有効と思われる CYA 濃度についても検討したので報告する。

II 実験方法

実験1：同種全層角膜移植

体重約3kgの成熟白色家兎32匹を用い、すべて右眼を術眼とし、ミドリンP[®]頻回点眼にて極大散瞳させ、キシラジン塩酸塩(セラクター[®])入り塩酸ケタミン(ケタラール[®])50mg/kgの筋注にて麻酔し、瞬膜を切除した。交換移植は2匹の白色家兎の右眼を直径7mmのトレパンで同時に抜き、直ちにgraftを交換し、8-0 パージンシルクで16針端々縫合を行った。また術中、前房内フィブリン析出を防ぐために1,000単位ヘパリンナトリウム点眼を行い、手術は顕微鏡下で可能な限り無菌的に行った。術後I群10匹を0.025% CYA 点眼群、II群10匹を0.05% CYA 点眼群、III群10匹を対照として α -CD点眼群とし、各群と

もに1日4回点眼し、術後5日目まではペニシリンG 2万単位を毎日筋注し、術後14日目までは抗生剤(トブラマイシン)と散瞳剤(ミドリンP[®])点眼を行った。角膜抜糸は、術後14日目とし顕微鏡下にて行った。点眼投与期間は、各群とも手術日より50日間投与し、投与中止後更に50日、計100日間観察した。今回の実験は、前回0.025% CYA 点眼100日間投与し、100%透明治癒率を得た同様実験⁷⁾よりも更に感作を強める目的で、術後14日目に10×10mmの交換皮膚移植を背部に追加した。

実験2：異種表層角膜移植

実験1で、0.05% CYA 点眼がよい結果を得たため、体重約3kgの白色家兎16匹と体重約0.5kgのウイスターラット8匹を用い実験1と同様の術前処置を施行し、ラットから白色家兎への異種表層角膜移植を行った。ラット角膜はほぼ直径7mmのため角膜輪部で角膜を切除後、内皮とデスメ膜をスパーテルで剝離し、graftとした。家兎角膜は、7mmトレパンで厚さ約0.1mm切開を入れ表層のみ剝離を行い、ラット角膜を10-0 ナイロンで4針端々縫合後連続縫合した。術後14日間は抗生剤(トブラマイシン)と散瞳剤(ミドリンP[®])点眼を行い、14日目に顕微鏡下にて角膜抜糸を行った。I群8匹には0.05% CYA 点眼を1日4回、50日間投与し、II群8匹は対照として何も点眼せずに両群術後100日間経過観察した。

免疫反応の定義として、術後2週間以内の移植片混濁は、術中の操作による内皮損傷や術後感染症などがあるので除外とした。術後2週間以上経過した移植片に発生し、移植片の上皮層に0.1%トリパンブルー染色に染まる rejection line を観察したもの、rejection line を認めないが移植片内の血管侵入を伴う進行性に混濁を認めたものを免疫反応とした。

III 結 果

実験1、I群、II群に術後14日以内の混濁例が各々1匹認め、この2匹は脱落と見なし、各群10匹ずつとした。実験1の透明維持率は(図1)のごとく、術後59日目の点眼終了時において、対照群では10眼中8眼に免疫反応を認めたのに対し、0.025% CYA 点眼群では10眼中6眼に免疫反応を認め、0.05% CYA 点眼群では、10眼中2眼に免疫反応を認めた。今回の実験では、一度出現した免疫反応は点眼の継続にかかわらずすべて進行性に混濁した。Fisherの直接確率計算にて統計的有意差検定を行い、対照群と0.05% CYA 点

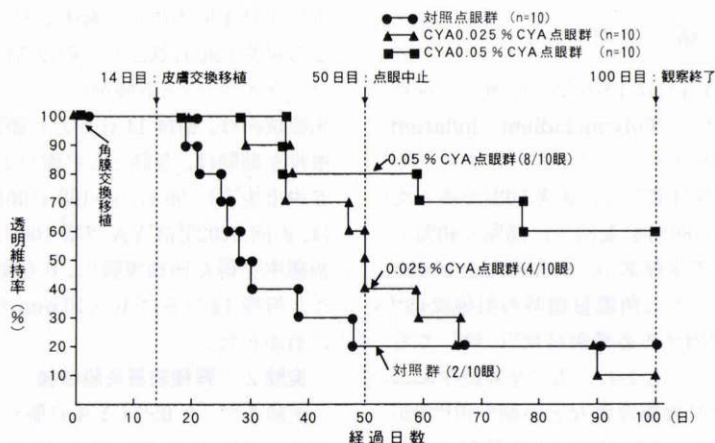


図1 交換角膜移植 (+交換皮膚移植) 眼での 0.025%, 0.05% シクロスポリン点眼後の透明維持率。

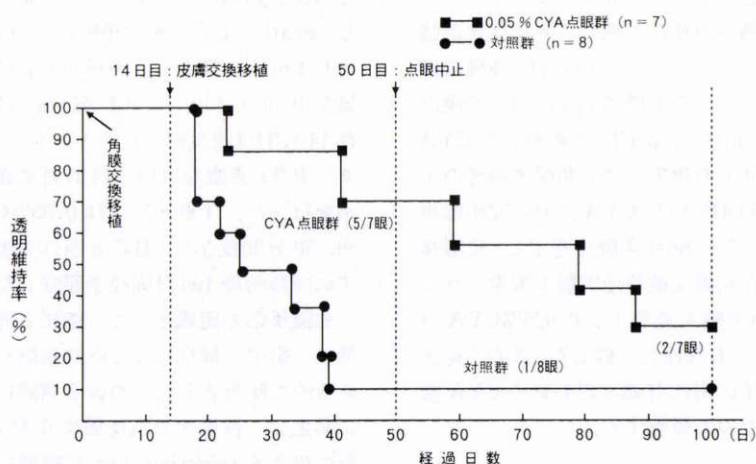


図2 家兎眼にラット角膜を表層移植した眼での 0.025% シクロスポリン点眼後の透明維持率。

眼群のみ 5% の危険率で有意差を認めた。点眼中止後さらに 50 日目、術後 100 日目の透明維持率は対照群では変わらなかったが、0.025% CYA 点眼群では、さらに 3 眼、0.05% CYA 点眼群では 2 眼の免疫反応を認めた。実験 2 のラット角膜の家兎眼への表層角膜移植での透明維持率は (図 2) のごとく、対照群では術後 50 日目までに 8 眼中 7 眼に免疫反応を認め、0.05% CYA 点眼群では 7 眼中 2 眼に免疫反応を認め、点眼中止後さらに 3 眼に免疫反応を認めた。Fisher の直接確立計算において 5% の危険率にて有意差を認めた。

IV 考 按

最近の臓器移植の成功率は、シクロスポリン (CYA) の発見以来、飛躍的に向上してきている。しかし、その使用頻度の増加に伴い、副作用、特に腎毒症の報告^{1)~3)}も増え、現在では副作用を少なくし、効果を十分得るためにシクロスポリンの減量、他剤併用などの方法が検討されている。また、比較的副作用が少なく、低濃度で強力な免疫抑制効果を有する新しい免疫抑制剤として FK-506, 15-deoxyspergualin も注目されて

いる。このような現状の中で、角膜移植後の免疫抑制は、現在もステロイド剤が主流となっている。CYA の眼科領域での有効性は早くから示唆されており、薬理学的には T 細胞増殖因子であるインターロイキン 2 を含むサイトカインの産生および遊離受容体の発現を阻害し、細胞障害性 T 細胞の活性化を抑制する。主としてヘルパー T 細胞を抑制するが、サブプレッサー T 細胞の活性化に対し、その機能を阻害しない。種々のマイトジェンにより刺激活性化されたリンパ球の増殖反応を抑制する。網膜可溶性抗原 (S 抗原) によって引き起こされる実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) の発症および免疫反応を抑制するなどの強力な免疫抑制作用を有することが示されている^{8)~10)}が、一方前述したような全身投与で生じる副作用は投薬中止すれば回復するといわれているが、腎、肝障害のある患者、高血圧症の患者では、使用が制限される。これらの点から眼科領域では、点眼剤の開発が待たれていた。CYA は水に溶けにくいため、最初は油性の点眼剤として使用されていたが、角膜上皮は疎水性で油性剤の上皮層への透過性は悪く、眼刺激症状が強いといった欠点のため実用化には至らなかった。そこで Alba ら¹¹⁾、金井ら⁸⁾は、既に各種溶解剤における CYA の角膜透過性につき検討し、 α -CD を用いて溶解した CYA 点眼が低濃度かつ今までの報告よりも角膜透過性のよいこと、最大限 0.075% までしか溶解しないこと、0.075% CYA 点眼液は頻回点眼で最表層細胞に軽度の組織障害を認めたことなどを報告している。シクロデキストランは 6~12 のグルコース分子が α -1.4 グルコシド結合により、環状結合した王冠状の非還元性のマルトオリゴ糖である。分子構造モデルから明かなように、シクロデキストリンは、分子内に特徴的な疎水性の領域を有し、その空洞内に多くの有機・無機化合物をゲスト分子として取り込み、包接化合物を形成することにより、ゲスト化合物が本来有している物理的・化学的・生理的性質を変化させる特異な能力を持つことが知られている¹²⁾。特に難水溶性薬物は、シクロデキストリンに包接されることにより、溶解性・安定性の向上、刺激性の軽減の効果がみられる。したがって今回の実験は、 α -CD を CYA を溶解補助剤とした 0.025%、0.05% の CYA 点眼剤を作製し使用した。この 0.025% CYA 点眼は、過去の脂溶性剤で溶解した 1~2% CYA 点眼に比べ 5~10 倍角膜実質組織への移行が良く、1 日 4 回 100 日投与後でも組織学的に对照 (α -CD) と比較しても大きな異常を認めず副作用の点

からも十分使用可能と思われた。過去に高野ら⁷⁾は、0.025% CYA 点眼を用いた同様の家兎角膜交換移植実験にて 1 日 4 回点眼、術後 100 日間投与にて 100% の透明治癒率を得ている (对照として α -CD < 40 mg/ml > 点眼では 40% の透明治癒率)。しかし、交換移植後に免疫反応を起こした家兎を用いた再移植実験では 66% (2/3) の透明治癒率であり、また、免疫反応症を確認した時点から、0.025% CYA 点眼を 1 日 4 回投与した実験では、rejection line 出現初期に点眼開始すれば、rejection line 消失・血管消退傾向を認め、100% (5/5) 透明性を回復しているが、移植片角膜の 2/3 以上に rejection line が進行した時点で点眼開始した 2 眼では、CYA 点眼にもかかわらず、血管侵入の増強とともにどちらも混濁した。また 0.025% CYA 点眼にて免疫反応を抑えることのできた 5 眼中 2 眼に CYA 点眼中止後 40 日以内に拒絶反応の再発を認めている。これらの事実から血管侵入の少ない初回角膜移植例であれば、術後早期に 0.025% CYA 点眼を開始し、3 か月以上維持する事で良好な結果を得られると予想される。しかし 1958~1989 年の順天堂大学における全層角膜移植の透明治癒率を見ると円錐角膜 92.7%、角膜白斑 67.9%、移植後混濁 41.6% であり、実際臨床問題となるのは血管侵入の高度な症例、再移植症例などに対する移植である。そこでより条件の悪い host 角膜を想定した実験として、家兎角膜交換移植実験に、皮膚移植を追加することで、感作を増強させ、0.025%、0.05% CYA 点眼を比較する実験を試みた。結果は 0.05% CYA 点眼が優位に高い透明維持率を得たため、更にヘテロでの表層角膜移植実験を施行した。結果は実験 2 においても、对照群に比べ、有意に高い透明維持率を得ている (実験 1 で用いた对照群 α -CD 点眼には免疫抑制効果を認めない、実験 2 では無処置を对照群とした)。しかし点眼中止後 50 日間に透明であった 7 眼中 3 眼に免疫反応を認めている。今回の実験からは、臨床応用にあたり、条件の悪い host 角膜においては、0.025% CYA 点眼より、0.05% CYA 点眼がより有効であるという結果を得た。眼局所では病理学的にも副作用を認めない点より、0.05% CYA 点眼は臨床応用可能と思われるが、術後早期より使用し、3 か月以上点眼を続ける必要があり、今後副作用を始めとした安全性に十分注意をして、使用していくことが不可欠と思われた。現時点では、CYA 点眼が眼科領域における臨床応用の最有力候補であるが、今後より新しい免疫抑制剤の FK-506、15-deoxyspergualin も

実用化に向けて実験中であり、比較検討を進めていく予定である。

本論文の要旨は、第95回日本眼科学会総会(1991)において報告した。また本研究の一部は、文部省科学研究費一般研究C2670795によるものである。

文 献

- 1) **Landsberg D, Rae A, Chiu A, Werb R, Taylor P, Chan-Yan C, et al:** The effect of triple therapy on cyclosporine nephrotoxicity and hypertension in renal transplantation. *Transplant Proc* 21: 3323—3324, 1989.
- 2) **Ahmed E, James DP, Jorge R, Ruud AFK:** Conversion from standard cyclosporine to low-dose cyclosporine in liver transplant recipients: Effect on nephrotoxicity and hypertension beyond one year. *Transplant Proc* 21: 2238—2239, 1989.
- 4) **Shepherd W, Coster D, Cin Fook T, Rice N, Jones B:** Effect of cyclosporin A on the survival of corneal grafts in rabbits. *Br J Ophthalmol* 64: 148—153, 1980.
- 5) **Nussenblatt RB, Palestine AG, Rook AH, Irwin S, Waldon BW, Igal G:** Treatment of intraocular inflammatory disease with cyclosporin A. *Lancet* II: 235—238, 1983.
- 6) **Kanai A, Alba R, Takano T, Kobayashi C, Nakajima A, Kurihara K, et al:** The effect on the cornea of alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporin eye drops. *Transplant Proc* 22: 3150—3152, 1989.
- 7) **高野俊之, 小林千博, Ala RM, 金井 淳:** 0.025% シクロスポリン点眼の角膜組織への影響及び、家兎角膜移植での眼角膜移植での免疫抑制効果について. *日眼会誌* 96: 834—840, 1992.
- 8) **Borel J, Feurer C, Gubler H:** Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6: 468—475, 1986.
- 9) **Wiesinger D, Borel J:** Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. *Immunobiology* 156: 454—463, 1979.
- 10) **Dongworth D, Klaus G:** Effects of cyclosporin on the immune system of the mouse. I. Evidence for a direct selective effect of cyclosporin A on B cells responding to anti-immunoglobulin antibodies. *Eur J Immunol* 12: 1018—1022, 1982.
- 11) **Alba RM, 金井 淳, 高野俊之, 小林千博, 中島章:** The effect on the cornea of various vehicles for cyclosporin eye drops. *眼紀* 40: 902—908, 1989.
- 12) **村信之:** 用途広がるサイクロデキストリン. *Bio Industry* 2: 261—271, 1985.