

三叉神経切断眼における角膜上皮の創傷治癒速度について

荒木かおる¹⁾, 木下 茂²⁾, 桑山 泰明³⁾, 大橋 裕一⁴⁾

大阪大学医学部眼科学教室¹⁾, 京都府立医科大学眼科学教室²⁾

大阪厚生年金病院眼科³⁾, 愛媛大学医学部眼科学教室⁴⁾

要 約

三叉神経切断術を施行した家兎角膜上皮の創傷治癒速度について検討した。7匹の白色家兎の片側三叉神経の節後線維を経頭蓋法により切断し、14日後、両眼の角膜中央部にn-ヘプタノールを用いて10mm径の上皮欠損を作製した。欠損作製後は12時間毎に写真撮影を行って上皮欠損の面積変化を記録し、コンピュータ画像処理により創傷治癒速度を算出した(実験1)。さらに、第1回目の上皮欠損が完全に治癒してから14日後に、再度上皮欠損を作製して上記と同様の実験を行った(実験2)。創傷作成後12時間から48時間における角膜上皮の創傷治癒速度(mm²/hr)は、実験1において三叉神経切断眼で1.28±0.25、対照群で1.39±0.31、実験2において三叉神経切断眼で1.05±0.20、対照眼で1.44±0.22であり、実験2においては三叉神経切断眼の治癒速度が有意に遅延していた(p<0.05)。これらの結果は、三叉神経麻痺眼では角膜上皮の創傷治癒が遅延することを示唆している。(日眼会誌 97:906-912, 1993)

キーワード: 三叉神経, 神経切断, 角膜上皮, 創傷治癒, 治癒速度

Corneal Epithelial Wound Healing in the Denervated Eye

Kaoru Araki¹⁾, Sigeru Kinoshita²⁾, Yasuaki Kuwayama³⁾ and Yuichi Ohashi⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

²⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

³⁾Eye Clinic, Osaka Kosei Nenkin Hospital

⁴⁾Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine

Abstract

We investigated the rate of corneal epithelial wound healing in rabbits which had undergone surgical trigeminal denervation. Seven New Zealand albino rabbits underwent unilateral neurotomy of postganglionic trigeminal nerves via intracranial route. At 14 days after operation, 10 mm diameter central corneal epithelial defects were created in both eyes by n-heptanol. The area of epithelial defect was then photographed at 12-hour intervals and the epithelial healing rate was calculated (1st experiment). At 14 days after epithelial wound closure, the corneal epithelium was again denuded in a similar fashion (2nd experiment). The epithelial healing rate of the denervated and control eyes respectively were 1.28±0.25 and 1.39±0.31 (mm²/hr) in the first experiment, and 1.05±0.20 and 1.44±0.22 (mm²/hr) in the second. There was a statistically significant difference in the epithelial healing rate between the two groups in experiment 2 (p<0.05). These results indicate that corneal epithelial wound healing is impaired in the denervated eye. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 906-912, 1993)

Key words: Trigeminal nerve, Denervation, Corneal epithelium, Wound healing, Healing rate

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4年12月28日受付, 平成5年3月13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 553, Japan

(Received December 28, 1992 and accepted in revised form March 13, 1993)

I 緒 言

実験的に三叉神経を切断すると、同側角膜上皮の増殖能低下や透過性亢進などが生じることが報告されている^{1)~5)}。また、我々⁶⁾も三叉神経切断眼において角膜上皮層の菲薄化が生じることを既に報告している。これらの事実は、三叉神経が単に知覚のみではなく、角膜上皮細胞の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。実際、三叉神経が障害されたような患者で、兎眼や涙液減少などの危険因子を伴わない場合でも、同側角膜に遷延性上皮欠損や潰瘍を起しやすことが臨床的に知られている⁷⁾⁸⁾。これは、三叉神経が障害された眼に強いストレスがかかると角膜上皮の異常が顕在化し、遷延性の上皮障害を起すためではないかと考えられている。

一方、三叉神経の障害が角膜上皮の創傷治癒過程に直接的な影響を与えているのかどうかについてはこれまでに種々の報告があるが⁹⁾¹⁰⁾、現時点では確固たる結論は出ていない。そこで今回、外科的な三叉神経切断モデルを用いて、三叉神経の障害が角膜上皮修復にどのような影響を及ぼすかを検討した。

II 方 法

1. 使用動物と外科的三叉神経切断

7匹の白色家兎(3.0~3.5 kg)の左側三叉神経節を経頭蓋法にて外科的に切断した。切断法は既に報告した方法に従った¹⁰⁾。右側は無処置とし、右眼角膜を各々の実験の対照とした。なお、実験はすべて『動物の保護及び管理に関する法律』に則して施行した。

2. 角膜上皮欠損の作成と観察

1) 実験1

外科的な三叉神経の切断14日後に、ketamine hydrochloride (100 mg/kg)の筋注による全身麻酔とoxybuprocaine hydrochlorideの点眼麻酔を施し、10 mm径の角膜上皮欠損を両眼角膜中央部にn-ヘプタノールを用いて作成した。具体的には、10 mm径のガラス試験管の開口部にくりつけたガーゼにn-ヘプタノール液を十分浸した後、濾紙上で余分な液を十分拭き取ってから角膜中央部に約60秒間押し当てた。処置後は500 mlの生理食塩水でn-ヘプタノールを十分に洗い流した。上皮欠損作成後は、欠損部が完全に治癒するまで12時間毎にスリットランプで観察し、同時に写真撮影を施行した。上皮欠損部の染色には0.5%メチレンブルー液を用いた。また、感染防止のため抗生物質の眼軟膏を連日塗布した。

2) 実験2

実験1で作成した上皮欠損が完全に治癒してから14日後に、上記と同じ方法で再び上皮欠損を作成した。以後も実験1と同じく、12時間毎に上皮欠損部を写真撮影して治癒過程を記録した。観察期間後2週間を経て全例において上皮欠損が完全に治癒してから、さらに2週間後、すべての家兎の眼球を摘出し、10%中性ホルマリンにて固定した。次いで、型のごとく薄切切片を作成後にヘマトキシーン-エオジン染色を施行して組織学的な検討を行った。

3. 角膜上皮創傷治癒速度の解析

上皮欠損の面積はデジタイザー(LA-555, PIAS/Tokyo)を用いて解析した。まず、直径1 cm(面積:0.78 cm²)を紙上に作製し、イメージアナライザー

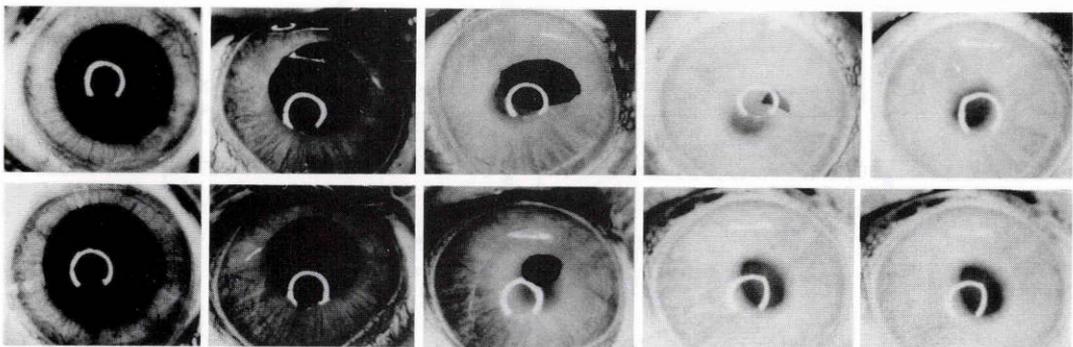


図1 実験1における角膜上皮創傷治癒過程の1例。

上段：神経切断眼，下段：対照眼。創傷治癒作製時，24時間後，48時間後，72時間後，96時間後の角膜写真。角膜中央部に青く染色された部分が上皮欠損部である。

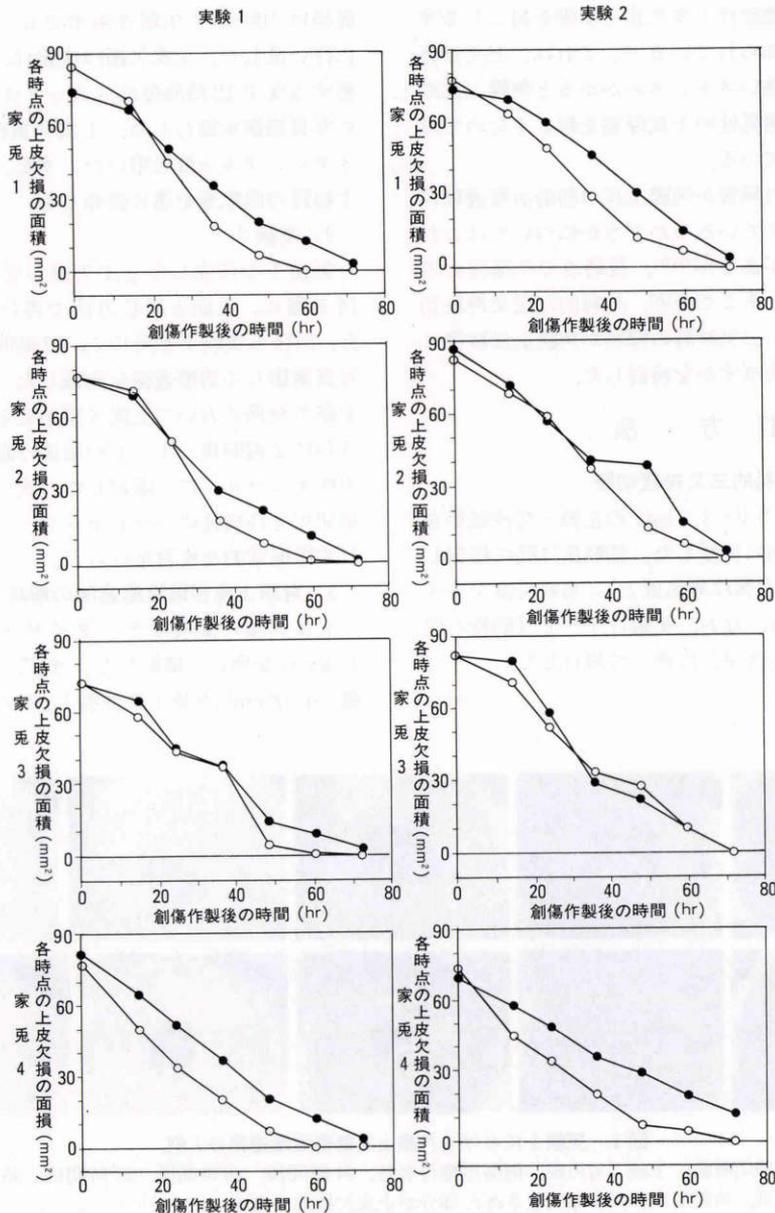
に取り込み、その面積を100%とし、続いて撮影記録した写真を取り込み、各々の時点の上皮欠損面積を%表示し、その値に0.78を掛けた数値をその時点の欠損面積とした。各々の家兎について、これらの上皮欠損面積の変化を経時的にグラフ化した。各眼において、STAD VIEW SE (Macintosh, Apple Computer Japan, Inc.)を用いて、経過時間をX、その時点の上皮欠損の面積をYとして単純回帰直線を求め、創傷作成12時間後から48時間後までの係数を創傷治癒速度

とした。なお、群間の平均値の差の検定にはpaired T-testを用いた。

III 結果

実験期間中にわたって家兎の全身状態は良好であった。なお、上皮欠損作成直後には軽度の結膜充血および浮腫を認めたが、これらは上皮の創傷治癒とともに次第に消失した。

創傷作成後から24時間毎の上皮欠損の治癒過程の



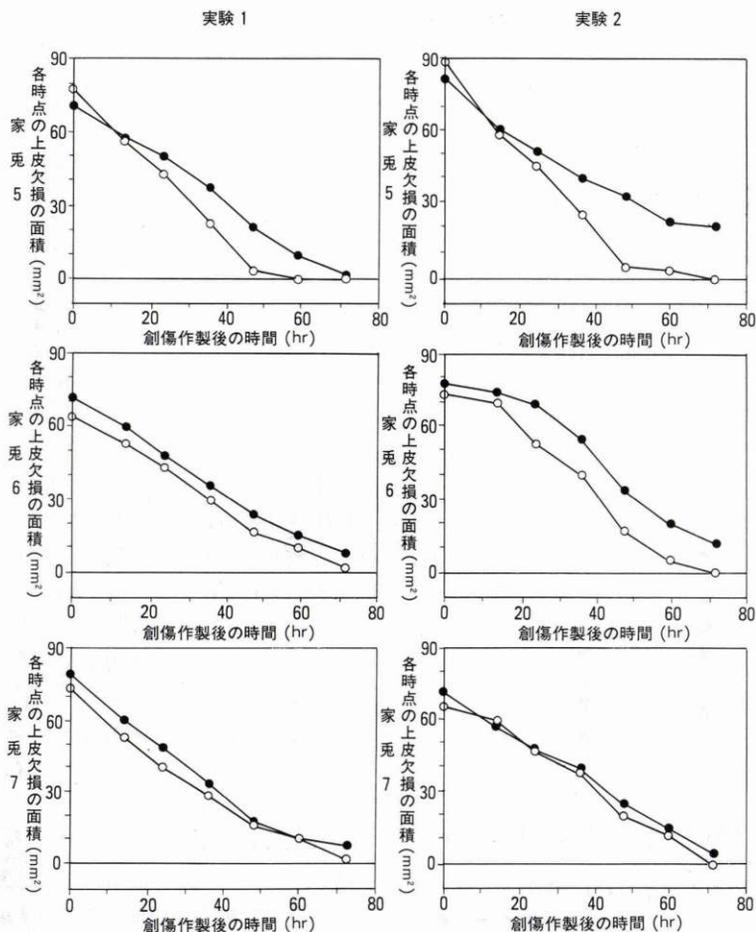


図2 実験1, 2における角膜上皮欠損の経時的变化。

黒丸は神経切断眼, 白丸は対照眼の変化を表す。個々の家兎における個体差が存在するが, 創傷作成12時間後から48時間後にかけては, ほぼ直線化している。この直線の傾きは対照眼に比して神経切断眼では小さく, 創傷治癒遅延を表している。

1例を図1に示す。対照眼では72時間後に上皮欠損は修復しているが, 神経切断眼では角膜中央部に依然として上皮欠損が認められる。各々の家兎における経時的な上皮欠損面積の変化を図2に示す。創傷作成12時間後から48時間後にかけて, 創傷治癒過程がほぼ直線化しており, この傾きは実験1では7眼中4眼で, また実験2では全例において, 対照眼に比して神経切断眼で小さかった。

創傷作成12時間後から48時間後における創傷治癒速度をみると, 表1のとおり, 実験1, 実験2ともに対照眼に比して神経切断眼では創傷治癒速度が遅延しており, paired-T testを用いて検討すると, 実験2で

は切断眼の創傷治癒速度が有意に低下していた ($p < 0.05$)。また, 対照眼の創傷治癒速度に対する神経切断眼の創傷治癒速度の比を検討すると, 全例において実験1に比較して実験2で低下しており, paired T testを用いて検討したところ, 神経切断家兎における創傷治癒遅延の程度については実験1と2の間に有意な差を認めた (paired T test, $p < 0.05$) (図3)。

なお, 上皮欠損の治癒後に角膜混濁, 血管新生などの異常所見は認められなかった。実験2で作成した上皮欠損は約2週間後には全例で完全に修復し, さらに2週間後の角膜上皮および実質の光学顕微鏡的組織像には図4のように異常を認めなかった。

表1 三叉神経切断眼の角膜上皮創傷治癒速度

家兎番号	実験 1		実験 2	
	神経切断眼	対照眼	神経切断眼	対照眼
1	1.19 mm ² /hr	1.52	1.15	1.54
2	1.40	1.93	1.04	1.68
3	1.75	1.31	1.39	1.47
4	1.31	1.26	0.86	1.12
5	1.09	1.58	0.81	1.60
6	0.98	1.03	1.19	1.51
7	1.27	1.09	0.94	1.13
平均値±標準偏差	1.28±0.25	1.39±0.31	1.05±0.20*	1.44±0.22*

*: (p<0.05)

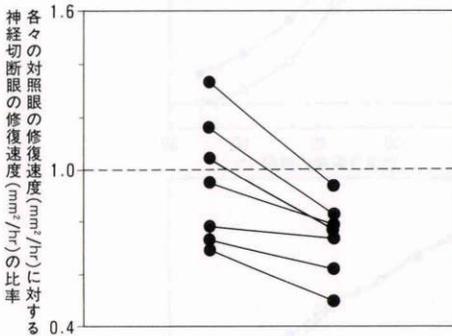


図3 実験1および実験2における上皮修復速度の比率(神経切断眼/対照眼).

神経切断眼の修復速度の比率が1未満のもの、すなわち神経切断眼に創傷治癒遅延を認めたものは、実験1では4例(57%)、実験2では6例(86%)であった。

IV 考 按

今回の検討により、三叉神経切断眼で角膜上皮創傷治癒が有意に遅延することが明らかとなった。今回の実験で我々は、神経切断法として直視下の外科的切断を採用した。この方法が家兎に与える侵襲には大きいものであるが、その切断効果は確実であり、角膜上皮の創傷治癒に及ぼす影響をより正確に捕えることが可能となるからである。例えば、過去の報告³⁾⁹⁾では神経切断法として熱凝固を採用しているものが多いが、こうした方法では三叉神経を直視できないため切断は不確実であり、このことがデータがばらつく原因になっていたとも考えられる。

実験2において、対照眼に比較して神経切断眼の創傷治癒速度がより多くの例で低下し、統計学的に有意

であったこと、また、対照眼に対する神経切断眼の創傷治癒速度の比が実験2において有意に低下していることから、上皮欠損が反復して作成されたようなストレスの強い状況では、三叉神経切断の影響がより大きく表現されるものと考えられた。したがって、より多数回にわたって上皮欠損を作成すれば、この傾向はより顕著になるのではないかと推察される。ただし、上皮欠損治癒後の光学顕微鏡レベルでの角膜組織所見には異常を認めなかった点から、三叉神経切断眼においては上皮の創傷治癒は遅延するものの、治癒する過程自体はある程度正常なプロセスを経るのではないかと推測された。実際、臨床的な神経麻痺性角膜炎とは異なり、両実験ともに上皮欠損は遷延化することなく、約2週間で完全に再被覆されている。日常臨床で見られる遷延化傾向と本実験の結果との差異についての明確な意味づけは困難であるが、基底膜のないような状況、例えば角膜実質層切除の実験系などを用いれば上皮創傷治癒が遷延化する可能性は十分にあると思われる。

さて Sigerman ら⁴⁾は、三叉神経を切断しても角膜上皮の創傷治癒速度は低下しないと報告している。しかしながら、pin prick test を用いて上皮欠損を作成した彼らの方法ではストレスが軽度であったため、有意差が出なかったのではないかと想像される。一方、Beurman ら³⁾⁹⁾は作成した上皮欠損が直径4mmと小さいきらいはあるが、今回の我々とほぼ同じ結果を報告している。ただし、彼らの報告によると、神経切断眼では創傷作成後15時間までに創傷治癒が対照眼に比して著明に低下しており、15時間後から40時間後までの創傷治癒速度は対照眼と大差を認めない。これは、神経切断術4日後の家兎を実験に使用したため、

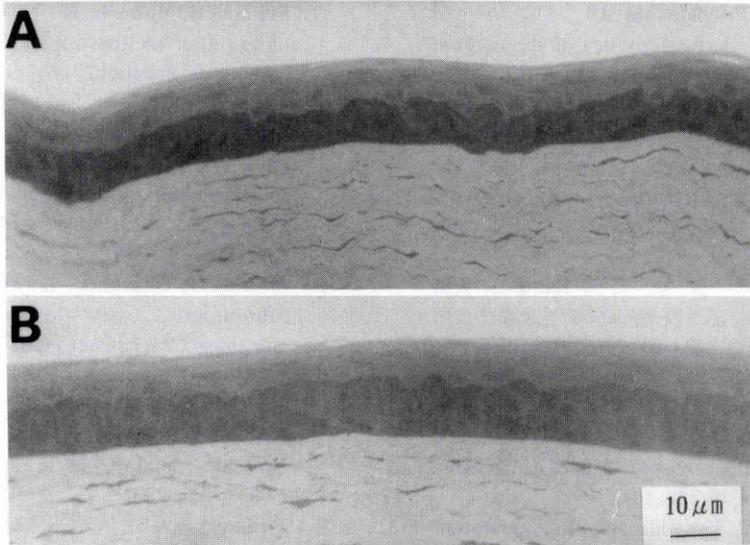


図4 実験2の上皮欠損が完全に修復後1か月目の角膜中央部上皮光学顕微鏡所見(HE).

A: 神経切断眼, B: 対照眼, 両者ともに角膜上皮細胞および上皮層, 実質には異常を認めない。

神経切断術による炎症が十分鎮静化されていなかったためではないかと推測される。なお、彼らは同時に上皮におけるフルオレスセンの透過性が亢進していることを示しており、我々の推測と同様に細胞間接着の低下を示唆している。今後、三叉神経眼でみられる上皮の創傷治癒異常を細胞の伸展・移動と増殖などの各ステップに分けて考察するには、今回我々が使用したような10 mm径程度の大きな上皮欠損が必要と思われる。

どのような異常が角膜上皮に生じているのかについては現状で全く推測の域を出ない。例えば、Mishimaら²⁾は三叉神経を切断した家兎角膜上皮細胞において分裂像の減少が認められたとしており、三叉神経切断眼における角膜上皮細胞の増殖能低下を示唆している。また、我々¹⁰⁾が報告した三叉神経切断眼における角膜上皮層の菲薄化という事実から考えれば、上皮細胞の接着能低下が生じている可能性もある。図4に示すように今回、創傷治癒後の神経切断眼では上皮層の菲薄化を認めなかった。これは、創傷作成により上皮細胞の増殖が促進された状態にあり、角膜上皮細胞の増殖、伸展、脱落という均衡が増殖優位になっている結果ではないかと推測できる。すなわち、神経切断眼においては、増殖能は正常に保たれているが、伸展がで

きない、もしくは脱落が亢進していることを示唆していると思われる。先にSugiuraら¹¹⁾が三叉神経切断眼の角膜上皮細胞を電子顕微鏡的に観察し、上皮細胞間隙の拡大を認めていることや、神経麻痺性の遷延性上皮欠損にフィブロネクチンの点眼が臨床的に有効であることは¹²⁾¹³⁾、伸展・移動あるいは接着能に異常が存在する可能性を示唆していると思われる。したがって、上皮創傷治癒に深く関与しているフィブロネクチン^{14)~16)}の分泌異常、細胞間接着に係わる各種プロテオグリカンの異常、基底膜成分であるラミニン合成低下、上皮細胞の移動能すなわちアクチン線維の異常、あるいはfocal contact部の蛋白異常などについて今後検討を重ねていく必要がある。

文 献

- 1) Paton L: The trigeminal and its ocular lesions. *Br J Ophthalmol* 10: 300-342, 1926.
- 2) Mishima S: The effects 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.
- 3) Beuerman RW, Schimmelpfennig B: Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial proteritis. *Exp Neurology* 69: 196-201, 1980.

- 4) **Sigelman S, Friedenwald JS**: Mitotic and wound-healing of the activities of the corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 52: 46-57, 1954.
- 5) **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.
- 6) 荒木かおる, 木下 茂, 孫 乃学, 桑山泰明, 大橋裕一, 真鍋禮三: 三叉神経切断の家兎角膜上皮に及ぼす影響. *日眼会誌* 96: 710-714, 1992.
- 7) **Pnnabecker CL**: Keratitis Nueroparalytica. *Arch Ophthalmol* 32: 456-463, 1944.
- 8) **De Haas EBH**: Desiccation of cornea and conjunctiva after sensory denervation. *Arch Ophthalmol* 67: 79-92, 1962.
- 9) **Beueuman RW, Tanelian DL, Schimmelpfenig B**: Nerve tissue interactions in the cornea. In: Cavanagh, H. Dweight (Ed): *The Cornea, Transactions of the world congress on the cornea III*. Raven Press, New York, 10: 59-62, 1988.
- 10) 荒木かおる, 大橋裕一, 桑山泰明, 木下 茂, 真鍋禮三: 栄養障害性角膜潰瘍モデルの作製—経頭蓋法による家兎三叉神経切断法—. *眼紀* 42: 857-860, 1991.
- 11) **Sugiura S, Matsuda H**: Electron microscope observation on the corneal epithelium after sensory denervation. *Jpn J Ophthalmol* 11: 207-212, 1967.
- 12) **Phan TMM, Foster CS, Boruchoff SA, Zaga-chin LM, Colvin RB**: Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 104: 494-501, 1987.
- 13) **Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R**: Fibroneactin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 101: 1046-1048, 1983.
- 14) **Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R**: Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Cur Eye Res* 1: 553-556, 1982.
- 15) **Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB**: Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest* 45: 120-129, 1981.
- 16) **Fujikawa LS, Foster CS, Gipson IK, Colvin RB**: Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds. Immunofluorescence and ultrastructural studies. *J Cell Biol* 98: 128-138, 1984.