

新しい強角膜保存液の角膜内皮細胞への影響

—走査型電子顕微鏡による形態学的検討—

荻野 晴義, 弓狩 健一, 寺田 久雄, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

要 約

新しい強角膜保存液の角膜内皮細胞への影響について、走査型電子顕微鏡による検討を行った。保存液として二種類の組成液（保存液 I, II）を検討対象とし、OPTISOL[®]と比較検討した。保存液 I, II は基本的な組成液である TC-199 の濃度以外は共通成分となっている。保存液 I, II, OPTISOL[®] 中に白色家兎の強角膜片 1 個を 4°C の状態で、保存液 I, II については保存期間、3, 7, 10, 14 日間とし、OPTISOL[®] 内には 7, 10, 14 日間保存し、各期間について走査型電子顕微鏡により角膜内皮細胞を観察した。保存 3 日目までは、各保存液とも

内皮細胞は良好な状態に観察できた。保存 7 日目以降になると、保存液 I は他の保存液に比べて細胞境界の不明瞭化、内皮細胞表面の凹凸不整が多くみられ劣っていると考えられた。保存液 II, OPTISOL[®] は、ほぼ同等の保存性を有すると考えられた。保存時間の延長に従い保存液 II, OPTISOL[®] の両者において角膜内皮細胞の表面に凹凸不正が認められるようになった。（日眼会誌 99 : 387—391, 1995）

キーワード：強角膜保存液, OPTISOL[®], 家兎, TC-199

Effect of a Newly Developed Corneal Storage Medium on Corneal Endothelium —Morphological Study by Scanning Electron Microscopy—

Haruyoshi Ogino, Kenichi Yukari, Hisao Terada and Mitsuru Sawa

Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

Abstract

We compared the effects on corneal endothelium of the new storage mediums I and II with those of OPTISOL[®]. Storage mediums I and II had the same formula, i.e., 0.1% hyaluronic acid, except for the concentration of basic medium TC-199. I contained 70% of the TC-199 concentration of OPTISOL[®] and II contained 80%. Rabbit corneas were stored in storage mediums I and II for 3, 7, 10 and 14 days and in OPTISOL[®] for 7, 10 and 14 days at 4°C. After the 3-day storage period, endothelial cells were preserved in good condition. After the 7-day storage

period, medium I showed better preservative ability in endothelial configuration than the other two storage media. Medium II and OPTISOL[®] showed a similar storage potential morphologically. With increasing storage time, endothelial cells showed an irregular surface and a less defined cellular edge in both media II and OPTISOL[®]. (J Jpn Ophthalmol Soc 99 : 387—391, 1995)

Key words : Corneal storage medium, OPTISOL[®], Rabbit, Sclero-cornea, TC-199

I 緒 言

角膜の保存は良好な移植成績を得る上に重要であるだけでなく、手術実施時期を決定する上で極めて重要な因子である。すなわち、移植術において従来からの全眼球保存法はその有用性に優れているが、保存期間が短いと

の欠点があった。しかし、移植必要数に対しドナー数が不足している我が国においては提供眼を待つて移植術がなされる場合が多く、この保存期間は必ずしも問題とはなされないで経過してきた。近年、提供眼の有効活用の面から角膜保存期間延長の必要性が高まり、強角膜片保存法が臨床の場でしばしば用いられるようになってきて

別刷請求先：173 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 荻野 晴義
(平成 6 年 6 月 11 日受付, 平成 6 年 11 月 14 日改訂受理)

Reprint requests to: Haruyoshi Ogino, M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine,
30-1 Ouyaguchikamimachi, Itabashi-ku Tokyo 173, Japan

(Received June 11, 1994 and accepted in revised form November 14, 1994)

いる。しかし、我が国には強角膜保存を目的とした保存液がないため、必要に応じて保存液を輸入しているのが現状である。今回我々は、ウサギの角膜を用いて、新しい強角膜保存液について走査型電子顕微鏡による角膜内皮の形態学的検討を行った。

II 方 法

1. 保存液の処方

保存液として、表1に示すような二種類の組成液を検討対象とした。保存液I, IIは基本的な組成液であるTC-199の濃度以外は共通成分となっている。保存液IのTC-199の濃度は7.35 mg/mlであり、これは今回対

表1 保存液I, 保存液IIとOPTISOL®の組成内容

組 成	保 存 液		OPTISOL®
	保存液I	保存液II	
基本溶液	TC-199 (75%)	TC-199 (85%)	TC-199 MEM
緩衝液	HEPES	HEPES	HEPES
抗生剤	Gentamicin	Gentamicin	Gentamicin
コンドロイチン 硫酸	2.5%	2.5%	2.5%
デキストラン	—	—	1%
ヒアルロン酸 ナトリウム	0.1%	0.1%	—
ATP	—	—	Adenocine, Inosine, Adenine
鉄	—	—	+
コレステロール	—	—	+
L-hydroxyproline	—	—	+
ビタミン	—	—	+
pH	7.455	7.480	7.25
浸透圧	329 (mOsm/kg)	351 (mOsm/kg)	351 (mOsm/kg)

ATP: Adenosine triphosphate precursors

照とした強角膜保存液 (OPTISOL®, Chiron-Intraoptics, 米国) に含まれているTC-199濃度の75%に相当する。保存液IIにおけるTC-199濃度は8.33 mg/mlであり、これはOPTISOL®に含有されているTC-199濃度の85%に相当する。保存液I, IIの実測浸透圧の値は、保存液Iは329 mOsm/kg, 保存液IIは358 mOsm/kgである。保存液はミリポアフィルターで滅菌後、40 mlずつに滅菌広口瓶に分注し実験まで4°Cに保存した。対照としたOPTISOL®の組成についても表1に併せて示す。OPTISOL®1瓶の容量は20 mlである。

III 実験方法

体重2.5~3.5 kgの白色家兎24匹を用いた。過剰のペントバルビタールナトリウム (ネンプタル®) を静注して家兎を屠殺し、直ちに眼球摘出を行い、角膜内皮細胞を傷害しないように輪部から約2 mmの部位で強膜切開を行い、強角膜片を作成し、試験保存液一瓶に強角膜片1個を4°Cの状態です定の期間保存した。保存液I, IIについては保存期間を3, 7, 10, 14日間とし、また、対照のOPTISOL®内には7, 10, 14日間保存し、各期間について4眼ずつ検討した。また、各期間において4眼を同時期に保存するのではなく、1~2眼ずつを時期をずらして保存した。

組織学的検討方法としては、4°Cで一定期間保存した強角膜片を直ちに2.5% グルタル・アルデヒドおよび1% オスミウム酸で二重固定した。比較対照として家兎眼球摘出後、直ちに強角膜片を作成し室温で同様に固定した。強角膜試料をアルコール系列で脱水後、臨界点乾燥装置 (HCP-2 CRITICAL PORT DRYER, 日立) を用いて乾燥、金蒸着後 (Quick Auto Coater, サンヨー電子), 走査型電子顕微鏡 (ACPHA-10, 明石) を用いて

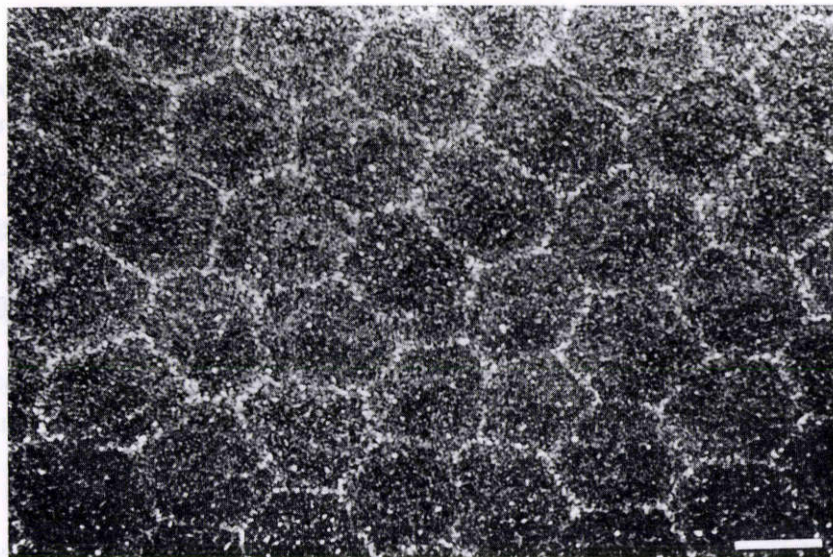


図1 角膜内皮細胞の走査型電子顕微鏡写真。
摘出後直ちに固定。バーは1 μm

角膜内皮細胞を観察した。

IV 結 果

動物の個体差および実験誤差を眼球摘出後、直ちに室温で固定した標本で検討したところ、標本の周辺部においては実験操作上によると思われるばらつきが認められるものの、標本の中央部付近はそのようなばらつきは少なく、個体差および実験誤差は許容範囲にあるものと考えた。

図1に眼球摘出直後の強角膜片、図2に保存3、7日の走査型電子顕微鏡像を示す。強角膜片作成直後に室温で固定した標本では、内皮細胞表面は平滑で microvilli、細胞間の境界が明瞭に観察できる。保存3日目では、保存液IIで内皮細胞の大小不同が認められるものの、保存液I、IIとも内皮細胞の表面は平滑で、microvilli、細胞境界とも明瞭に観察できる。保存7日目においては、保存液Iに保存した角膜内皮細胞の所々に小円孔が認められるようになり、microvilliも不明瞭となるが、細胞境界は明瞭に観察できる。

保存液IIでは、microvilliの消失が認められ、内皮細胞表面の平滑がやや損なわれるものの、細胞境界は明瞭で

ある。OPTISOL®では、microvilliの消失、内皮細胞表面の軽度の凹凸、そして所々内皮細胞に亀裂が認められるが、細胞境界は明瞭であり、保存液IIとほぼ同程度の状態であると考えられる。

図3に保存期間10、14日間の角膜内皮細胞の走査型電子顕微鏡像を示す。保存10日目においては、保存液Iでは内皮細胞表面に凹凸が認められ、細胞境界も所々不鮮明な部分がみられた。保存液IIでは、細胞表面の凹凸が目立つようになるものの亀裂などは認められず、細胞境界も明瞭である。OPTISOL®では、保存液IIに比べ細胞表面の凹凸が大きく、亀裂も認められる。保存14日目になると、保存液Iでは内皮細胞表面の変性が認められるようになり、細胞境界も全体に不明瞭になっていた。保存液IIでは内皮細胞表面に小円孔が認められるようになるものの細胞境界は明瞭である。OPTISOL®では内皮細胞表面の亀裂が多くなり、また、凹凸も著明となるものの細胞境界は明瞭である。

全体を通して、保存液I、IIでは保存液IIの方が保存状態は良好であった。さらに、保存液IIはOPTISOL®とほぼ同程度の保存状態を示した。

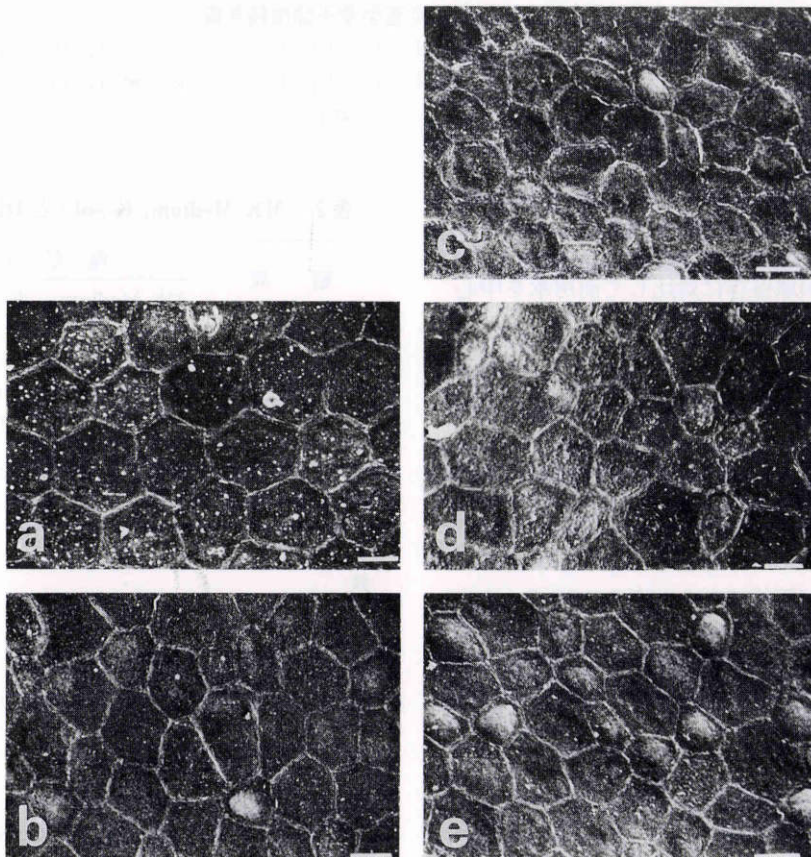


図2 角膜内皮細胞の走査型電子顕微鏡写真。

a: 保存液I, 3日間保存 b: 保存液II, 3日間保存 c: OPTISOL®, 7日間保存
d: 保存液I, 7日間保存 e: 保存液II, 7日間保存

バーはすべて1μm

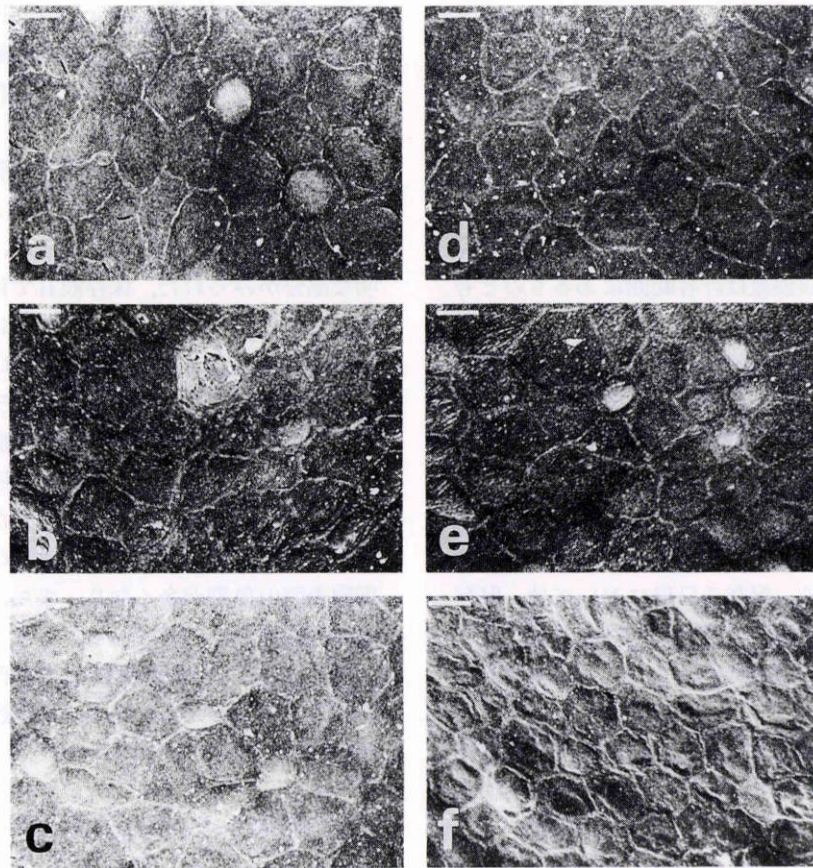


図3 角膜内皮細胞の走査型電子顕微鏡写真。

a: OPTISOL®, 10日間保存 b: 保存液I, 10日間保存 c: 保存液II, 10日間保存
 d: OPTISOL®, 14日間保存 e: 保存液I, 14日間保存 f: 保存液II, 14日間保存
 バーはすべて1μm

V 考 按

強角膜保存法は、全眼球保存に対比して前房水を中心とする角膜の代謝環境が良好となるため、保存期間を延長することが出来ると考えられている。しかし、角膜内皮細胞に障害を与えず、かつ、角膜組織の代謝を含め機能を維持するには保存液の組成、および保存期間中における微生物の増殖に対する配慮が重要である。

摘出された強角膜片は低温状態¹⁾に置くことにより、可逆的に内皮細胞を中心とする組織の代謝を低下させ、結果的に長時間の保存が可能であると考えられている。また、角膜移植に供される強角膜片は組織の透明性が高い方が手術時の操作性が良く、早期の視力回復に有用と考えられる。今回我々は、保存液の組成について、多施設で広く使用でき、調整も容易に出来るよう単純な組成および使用期限の延長化を目指して検討を行った。

McCareyら²⁾は、組織培養液であるTC-199を主成分とするM-K medium中で8~14日間、角膜内皮細胞を良好な状態で保存できることをスペキュラーマイクロスコープによって立証し、その後、米国での臨床の場で広く使用されてきた。近年、新しい強角膜保存液が開発さ

表2 MK-Medium, K-sol®とDEXSOL®の組成内容

組 成	保 存 液		DEXSOL®
	MK-Medium	K-sol®	
基本溶液	TC-199	TC-199 Earle's BSS	TC-199 MEM
緩衝液	—	HEPES	HEPES
抗生物質	Streptomycin Penicillin	Gentamicin	Gentamicin
コンドロイチン 硫酸	—	2.5%	1.35%
デキストラン	5%	—	—
アミノ酸	—	—	—
鉄	—	—	—
コレステロール	—	—	—
L-hydroxyproline	—	—	—
ビタミン	—	—	—
pH	7.25	7.455	7.480
浸透圧	290 (mOsm/kg)	不明	309 (mOsm/kg)

れ、TC-199, MEM (minimal essential medium) を主成分とする強角膜保存液としてOPTISOL®, Dexsol®, K-sol®などが用いられており、今回我々も主成分としてTC-199を用いた。今回、さらにTC-199以外の組成については、緩衝液としてはHEPESを使用した。コンドロ

イチン硫酸、デキストランについては、コンドロイチン硫酸には角膜内への水の取り込みの抑制による、膨潤抑制作用があるといわれており³⁾、また、デキストランは colloidal osmotic pressure による内皮保護とともに物理的な角膜膨潤抑制効果があるといわれている⁴⁾。しかし、一方で角膜保存中にデキストランは移植片の実質に取り込まれ、房水を実質内に吸引する可能性があり⁵⁾、また、角膜移植後の実質浮腫との関係も考えられており、デキストランの分子量を含めて検討する必要がある。これらのことから、保存液の内容にはデキストランよりコンドロイチン硫酸の方が角膜保存に適しているという臨床の場合からの指摘もあり、今回は平均分子量約3万のコンドロイチン硫酸を使用することとし、デキストランは組成に加えなかった。アミノ酸、ビタミン類などは単独溶液中では不安定であり、その有効期限は6か月を超えないとされる。また、TC-199 中にはこれらを補完する成分が含まれていることから、組成には加えないこととした。Sodium hyaluronate は角膜内皮細胞の保護作用とともに、近年、角膜上皮創傷治癒においてフィブロネクチンと類似した機序により障害部に隣接する細胞の移動を促進するとの報告⁶⁾がなされており、今回は、平均分子量約80万のヒアルロン酸ナトリウム、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を使用した。

選択した各成分の浸透圧を総和すると溶液の浸透圧は392 mOsm/ml となり、これは従来最も浸透圧が高い OPTISOL[®] よりも高い。高浸透圧は角膜内皮細胞に対し障害となるため、TC-199 濃度を OPTISOL[®] の85%に減ずることで浸透圧を約358 mOsm/ml に調整した保存液IIを作成した。また、同様に Dexsol[®] と OPTISOL[®] のほぼ中間の浸透圧(329 mOsm/ml)になるように TC-199 濃度を75%に減じ、調製した保存液Iについて検討を行った。浸透圧に関しては、今回の溶液の基本成分が OPTISOL[®] と同様の TC-199 であるため、OPTISOL[®] と同様の浸透圧となることが予測されたが、浸透圧に違いが生じた理由としてコンドロイチン硫酸などが考えられた。すなわち、OPTISOL[®] 内に含まれているコンドロ

イチン硫酸の分子量が不明であるため、今回我々が使用したコンドロイチン硫酸とは相違がある可能性がある。ただし、今回新たに組成に加えた sodium hyaluronate は、今回の容量では浸透圧に関与しないことは確認済みである。今回の形態的検討によれば、保存液IIはほぼ OPTISOL[®] と同様の角膜の保存効果を示したものの、保存液Iは形態的に OPTISOL[®] よりも保存効果が劣っているとの結果が得られた。これは、30 mOsm/kg 程度の浸透圧の差より、むしろ TC-199 の濃度不足が関係していると考えられた。今回、保存時間の延長に従い保存液II、OPTISOL[®] の両者において角膜内皮細胞の表面に凹凸不正が認められるようになったが、これらには浸透圧の問題、4°Cでの固定などの関与が考えられた。現在、保存液IIと OPTISOL[®] との間で細胞内構造に対する影響を透過型電子顕微鏡を用いて検討を行っており、その後、さらに家兎眼での移植実験を行い、透明度、角膜厚などの機能面からの研究を予定している。

文 献

- 1) **Mayes KR, Graham MV, Hodson S:** The deleterious effects of exogenous bicarbonate on the rabbit cornea undergoing prolonged refrigerated storage. *Exp Eye Res* 26: 555—560, 1978.
- 2) **McCarey BE, Kaufman HE:** Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 165—173, 1974.
- 3) 谷島輝雄, 松村 譲, 増田 清: Dextran を含有する眼内灌流液の角膜内皮に及ぼす影響. *日眼会誌* 88: 15—23, 1984.
- 4) **Lindstrom PL, Kaufman HE, Skelnik DL, Lass JH, Reinhart WJ, Musch DC, et al:** Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 114: 345—356, 1992.
- 5) 増田 清, 松山隆志, 井狩 隆, 伊藤 亮, 木下 茂: 新しい眼球保存液 (EP-II) の開発. *眼紀* 35: 1418—1427, 1984.
- 6) **Nishida T:** Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 53: 753—758, 1991.