

上松聖典 論文内容の要旨

主 論 文

Acute Corneal Epithelial Change after Instillation of Benzalkonium Chloride Evaluated Using a Newly Developed in vivo Corneal Transepithelial Electric Resistance Measurement Method

(新規生体角膜経上皮電気抵抗値測定法による
塩化ベンザルコニウム投与後の角膜急性変化の測定)

上松聖典、隈上武志、草野真央、山田浩喜、三島一晃、
藤村幸一、佐々木均、北岡隆

(Ophthalmic Research・39 巻 5 号 308—314 2007 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻眼科・視覚科学
(主任指導教員：北岡隆教授)

緒言

角膜は眼の最表層の組織であり、眼表層のバリア機能を担う。点眼治療は眼科疾患に対する主な治療法として重要であるが、その薬物や添加物は角膜上皮の障害を引き起こすことがある。そのため、点眼薬の角膜障害の評価は重要であり、これまで様々な評価法が用いられてきた。点眼後の角膜組織所見からその障害性を評価したり、培養角膜細胞に対する点眼薬の毒性試験もなされている。そして上皮のバリア機能を評価することのできる角膜上皮の経上皮電気抵抗値 (TER) 測定やフルオレセインの透過性を検討した実験も報告されている。

しかし、今までの実験や評価法では、角膜障害の量的な評価や、数秒単位の角膜障害性の評価は困難である。そこで今回我々は生体ウサギの角膜 TER を経時的に測定する装置を開発した。TER は角膜上皮の表層細胞と細胞間のタイトジャンクションに依存しており、TER の低下は角膜上皮障害を反映する。この装置を用いることで、より正確な TER と数秒単位の TER の変化を評価できる。この新しい実験で、ウサギ角膜の TER を測定し、高濃度塩化ベンザルコニウム (BAC) による角膜上皮の障害を評価したので報告する。

対象と方法

2.5～3.0 kg の雄性日本白色ウサギ 4 羽 8 眼を使用した。ケタラール 35 mg/kg とキシラジン 5 mg/kg を筋注し麻酔をかけた。セロハンテープで片眼を閉鎖し、もう片眼を開鎖した。18G 鋭針で角膜周辺部に切開を入れ、直径 1mm の銀・塩化銀電極を前房内に留置した。生体用接着剤で内径 6 mm のゴムリングを角膜上に固定した。生理食塩水 60 μ l を角膜上のリング内にいれた。生理食塩水内にもう一つの電極を接着させた。1 ml の生理食塩水と 0.05%BAC を含む生理食塩水を、吸引器であふれないように吸引しながら、リング内に入れ、置換した。TER の変化を 60 秒間ボルトオームメーターで測定し、レコーダーで記録した。その後投与薬を生理食塩水で洗浄し、もう片眼も同様に実験した。

実験後、ネブタールの過剰投与で安楽死させ、角膜を切除し、電子顕微鏡で観察した。

結果

生体ウサギの TER は平均 $602.3.0 \pm 195.0 \text{ ohm cm}^2$ であった。生理食塩水の投与ではほとんど TER に変化はなかった。0.05% BAC を投与すると急激に TER が減少した。投与前の TER を 100% とすると、5 秒後に $58.3 \pm 5.2\%$ とコントロールに比べ有意に低下した ($P < 0.05$) 10 秒後には $39.2 \pm 4.3\%$ 、30 秒後には $24.0 \pm 6.9\%$ 、とさらに有意に低下し ($P < 0.01$)、その後 TER の減少曲線は緩やかになり、60 秒後には $18.5 \pm 3.2\%$ となった。

角膜上皮を電子顕微鏡で観察すると TEM、SEM とともに表層細胞の破壊と表層細胞間の解離を認めた。

考察

今までの実験や評価法では、角膜障害の量的な評価や、数秒単位の角膜障害性の評価は困難である。遊離角膜片の TER の測定は量的に数値で障害を評価することができるが、角膜切除による角膜侵襲、TER が一定しないことが問題点であった。

これらの問題点を解消すべく、我々は新しい TER 測定方法を開発した。小電極を、生きたウサギの前房内と角膜上に置き、角膜の TER を測定した。これにより角膜侵襲を最小限に抑えることができ、安定して TER を測定できるようになった。また、ボルトオームメーターの測定値をレコーダーで記録することで、0.4 秒単位で TER の変化を記録することができた。これにより、短時間の TER の変化をより正確に測定でき、今までにないデータを得ることができた。

BAC は点眼薬に含まれる主な防腐剤であるが、その障害性は多くの報告で指摘されている。その界面活性作用は強力で、表層細胞の細胞表面だけでなく、細胞間接着も破壊し、最も強固な細胞間接着であるタイトジャンクションを破壊する。角膜上皮の TER は表層細胞とそのタイトジャンクションによる電気抵抗が大部分を占めており、これらが破壊されることで、電流が流れやすくなり、TER は減少する。

今回我々は 0.05% と高濃度の BAC による角膜上皮の障害の様子を TER により測定した。TER の減少は急速で高度であり、これは BAC による角膜障害は短時間でも強力である事を示している。電子顕微鏡でも角膜表装細胞の破壊と、細胞間の解離がみられ、60 秒という短時間でも角膜上皮が障害されることが確認された。

今回の実験により角膜上皮に対する BAC の短時間の強い影響が明らかとなった。このことで、点眼薬に含まれる防腐剤の濃度や、角膜に原液が直接接しない点眼方法が再考されるかもしれない。また、今回の実験は、短時間のわずかな角膜障害を捉えることができるため、薬物や物理的的刺激による角膜障害性の比較、そして市販点眼薬の角膜障害の判定ができる可能性がある。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。