

草野真央 論文内容の要旨

主 論 文

Evaluation of Acute Corneal Barrier Change Induced by Clinically Applied Preservatives Using Corneal Transepithelial Electric Resistance In Vivo

(新規生体角膜経上皮電気抵抗値測定法を用いた
点眼薬防腐剤による急性角膜バリア機能の変化の評価)

草野真央、上松聖典、隈上武志、佐々木均、北岡隆

(Cornea)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：北岡隆教授)

緒 言

角膜は眼球の最も前方にある透明な組織で、5層構造をとる。その中でも最表層にあるのが角膜上皮である。角膜上皮の表層細胞間はタイトジャンクションで結合し、外来物質に対し強固なバリア機能を担う。点眼薬は眼科の治療法の中で最もよく用いられるものであるが、ときに含有されている防腐剤等で角膜上皮障害をきたすことがある。塩化ベンザルコニウム (BAC) は最もよく用いられている点眼薬防腐剤である。

これまでの実験や評価法では、定量的に、短時間の角膜障害の評価を行うことは困難であった。当教室では既に角膜上皮の経上皮電気抵抗値 (TER) を生体ウサギにおいて秒単位で経時的に測定できる装置を開発した。TER の低下はバリア機能の低下すなわち角膜上皮障害を反映する。この装置を用いて高濃度である 0.05%BAC 点眼により、急速で高度な TER の低下を認めた。

今回我々はこの新しい評価法を用いて、市販点眼薬で実際に使用されている濃度の防腐剤による角膜上皮障害の評価を行った。また結果の裏づけとして細胞毒性試験も行った。

対象と方法

薬剤は BAC を 0.02~0.001% の 5 つの濃度で使用した。また、その他の防腐剤として、0.4%

パラベン、0.5%クロロブタノール、0.005%のグルコン酸クロルヘキシジン、2%ホウ酸、0.01%EDTAを使用、コントロールにはHBSSを使用した。

電気生理学的手法では、2.5~3.0kgの雄性日本白色ウサギ22羽44眼を使用した。ウサギに全身麻酔を施行後、銀/塩化銀電極を角膜上および前房内に留置し、HBSS60 μ lを角膜上に固定した径6mmのゴムリング内に投与した。その後各試薬1mlをHBSSと置換し投与した。電圧抵抗計EVOMX™を用いてTERを1分間経時的に測定し、各試薬を投与後5、10、30、60秒後のTERをプロットした。

細胞毒性試験では正常ウサギ角膜上皮細胞(NRCE)を96-wellプレートに播種し5日間培養後、70-80%コンフルエントの状態ですべての培養液を吸引除去した。各試薬100 μ lで置換し60秒間曝露後、細胞生存率をWST-1 Assay法で測定した。

結 果

TER測定法では0.02%、0.01%BACを投与後10秒で、コントロールより有意にTERが低下した($P<0.01$)。0.005%BACでは投与後60秒に有意なTERの低下が見られた($P<0.01$)。低濃度の0.002%、0.001%BACにおいてはコントロールとの有意差は認められなかった。BAC投与により濃度依存的、時間依存的にTERの減少が認められた。一方BAC以外の防腐剤投与後は、いずれにおいてもコントロールと比較して有意なTERの変化は認められなかった。

各試薬に60秒間曝露したあとの細胞生存率は、TERの結果と同様に0.02%、0.01%、0.005%BACにおいてHBSSと比較して有意に細胞生存率の減少を認めた($P<0.0001$)。また濃度依存的に減少を認めた。低濃度のBACにおいてはコントロールとの有意差は認められなかった。BAC以外の防腐剤投与後は、いずれにおいてもコントロールと比較して有意な細胞生存率の変化は認められなかった。

BAC投与後60秒におけるTERと細胞生存率の相関を調べたところ、両者は有意に正の相関を示した($r=0.94$ 、 $P<0.0001$)。

考 察

当教室で開発された新規生体角膜TER測定法では、実際の点眼薬使用の状態に近い、定量的である、短時間の障害性を評価できる、といった特徴があり、これまでにない新しい角膜障害評価法であるといえる。点眼薬は涙液で即座に希釈されるため短時間での評価が重要となるが、この測定法では秒単位の評価が可能である。

今回我々は臨床的に用いられている濃度の点眼薬防腐剤を投与し、角膜のTERの変化を測定した。BAC投与後に急性のTERの減少が認められた。細胞生存率でも同様の変化が認められ、角膜上皮細胞死がバリア機能の低下に関与していると思われた。BACは主要な防腐剤であり、その抗菌効果と製剤上の利便性から汎用されているが、界面活性剤として表層細胞間のタイトジャンクションを含めた細胞間結合の障害や細胞構造の破壊を引き起こす。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ものが大部分を占めており、これらが傷害を受けることによりTERの減少が見られる。BACによるTER減少効果は濃度・時間依存的であり、特に高濃度のBACでは注意が必要である。今回の知見は、角膜毒性の少ない点眼薬の開発の一助となる可能性がある。

新規生体角膜TER測定法は点眼薬防腐剤の角膜障害評価に有用であると思われた。

(備考) ※日本語に限る。2000字以内で記述。A4版。