



Effects of Various Eye Drops on Corneal Wound Healing after Superficial Keratectomy in Rabbits

谷, 恵美子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2597

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002597>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【170】

氏 名・(本 籍) 谷 恵美子 (愛媛県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1834号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月7日

【学位論文題目】

**Effects of Various Eye Drops on Corneal Wound Healing after
Superficial Keratectomy in Rabbits**

(家兎表層角膜切除後の創傷治癒に及ぼす各種点眼薬の影響)

審 査 委 員

主査 教授 根木 昭

教授 前田 盛 教授 奥村 勝彦

〔緒言〕

近年普及しつつあるエキシマレーザー表層角膜切除術後には上皮下混濁がほぼ必発し、軽度のものは消退するが重篤な例では恒久的な視力障害が残存する。その病態はメスによる機械的な表層角膜切除後に現れるのと同様の非特異的变化であるとされている。角膜創傷後に生じる角膜混濁の原因は、無秩序に過剰増殖した角膜実質細胞が産生するコラーゲンなどの細胞外基質の異常な蓄積によるものとされている。

表層角膜切除後には、消炎、疼痛軽減、上皮再生促進などの目的で、ステロイド、非ステロイド性消炎薬、ヒアルロン酸などの種々の点眼薬が用いられる。また最近、トラニラストがエキシマレーザー表層角膜切除術後の上皮下混濁の発生を抑制するとの報告がある。しかし、これらの点眼薬の角膜創傷治癒に及ぼす作用を組織学的に詳細に検討した報告は少ない。今回我々は、家兎を用いてこれら点眼薬の表層角膜切除後の創傷治癒に及ぼす影響について、特に上皮下混濁の発生に関与する実質細胞の増殖とコラーゲン産生に及ぼす作用に焦点を当て、組織学的に検討した。

〔方法〕

実験には日本白色家兎、体重2.5kg、雌20匹40眼を用いた。まず家兎を塩酸ケタミンの筋注(30mg/kg)で麻酔し、さらに、0.4%塩酸オキシブプロカインで点眼麻酔の後、円鋸刃を用いて角膜中央部に直径6mmの表層角膜切除を行った。家兎を5群に分け、術直後から、0.5%トラニラスト、0.1%リン酸ベタメサゾンナトリウム、0.1%ヒアルロン酸ナトリウム、0.1%ジクロフェナクナトリウム、生理食塩水(対照)の点眼を1日3回行った。抗生剤の点眼、眼軟膏は用いなかった。

術後1、2、3、4週後に前眼部所見を観察し、メチレンブルー染色により上皮欠損の有無を確認後、前眼部写真を撮影し、家兎を安楽死させ角膜を摘出した。角膜を中央部で半割し、ただちに一方の角膜片は ^3H -チミジンもう一方の角膜片は ^3H -プロリンにて標識した後、オートラジオグラフィに供した。

各薬剤の角膜実質細胞の増殖に及ぼす作用を検討するため、 ^3H -チミジンオートラジオ

グラフィにおいて、各群5切片について1切片当たりの ^3H -チミジン取り込み角膜実質細胞の総数を計測し、対照群と各群との有意差検定をDunnettの方法により行い、 p 値 <0.05 を有意とした。

角膜実質細胞によるコラーゲン産生に及ぼす作用については、 ^3H -プロリンオートラジオグラフィの光学顕微鏡写真を撮影し、 ^3H -プロリン取り込み角膜実質細胞の細胞質における銀粒子の密度を写真の上で肉眼的に比較検討した。

〔結果〕

1.前眼部肉眼所見

表層角膜切除術後1週目の時点では対照群、トラニラスト群、ヒアルロン酸群において上皮はメチレンブルーに染色されず、上皮が再生していたが、ジクロフェナク群とベタメサゾン群では上皮は完全には再生していなかった。術後2週目の時点ではいずれの点眼群でも上皮は再生されていた。

創部の混濁は、対照群とジクロフェナク群において術後3週目頃から肉眼的に混濁が顕著となり、4週目には高度の混濁が生じた。トラニラスト群、ヒアルロン酸群でも4週目に軽度の創部混濁を認めたが、その程度は対照群に比して抑制されていた。ベタメサゾン群では4週目でも創部混濁は極めて僅かであった。

2.組織学的所見

対照群では上皮下への角膜実質細胞の集簇所見及び活発なコラーゲン産生を示唆する所見があったが、ベタメサゾン群、トラニラスト群では実質細胞の増殖抑制、コラーゲン産生抑制所見を認めた。一方、ヒアルロン酸群では角膜実質細胞の増殖は対照群に比し促進されていたが、上皮下への実質細胞の異常な集簇所見はなく、実質細胞によるコラーゲン産生は対照群と同等であった。ジクロフェナク群では炎症所見が強く、創部の浮腫と炎症細胞浸潤が著明であった。また、内皮後面にretrocorneal membraneの形成もみられた。

組織片10mm当たりの ^3H -チミジン取り込み角膜実質細胞数は、対照群： 92.0 ± 3.4 、トラニラスト群： 26.2 ± 1.3 、ベタメサゾン群： 45.4 ± 1.6 、ヒアルロン酸群： 170.2

±4.8、ジクロフェナク群：72.2±4.1（数値は平均値±標準誤差）であった。対照群に比した³H-チミジン取り込み角膜実質細胞数は、1%の危険率でヒアルロン酸群では有意に増加しており、トラニラスト群、ベタメサゾン群およびジクロフェナク群では有意に減少していた。

【考察】

トラニラストは抗アレルギー作用を示すが、近年、線維芽細胞の過剰増殖ならびにコラーゲンの過剰蓄積を抑制することが明らかにされている。角膜創傷治癒過程では角膜実質においてtransforming growth factor- β (TGF- β)などのサイトカインが産生され、特にTGF- β が角膜実質細胞の筋線維芽細胞への形質転換と細胞外基質の産生に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。トラニラストはTGF- β の細胞外基質の産生作用を抑制するといわれており、今回の結果から、トラニラストの上皮下混濁抑制作用の機序として、角膜実質細胞の増殖を抑制するとともに、TGF- β を介する角膜実質細胞の形質転換および細胞外基質の産生を抑制することが考えられる。一方、エキシマレーザー表層角膜切除後の上皮下混濁は機械的表層角膜切除後にもみられる非特異的な癒着組織であるとされ、その病態は、Ⅲ型、Ⅳ型コラーゲン線維及び分子量の大きなプロテオグリカン等の細胞外基質が主な構成成分であると考えられている。したがって、今回の結果から、トラニラストが機械的角膜切除後の混濁のみならず、エキシマレーザー表層角膜切除後の上皮下混濁の抑制にも有効であることが推察される。

ベタメサゾンは今回の検討においては強い消炎効果と創傷治癒過程の遅延化により実質細胞の増殖及びコラーゲン産生を抑制し上皮下混濁の抑制したと思われた。しかしステロイドは動物実験では有効であっても、ヒトでの有効性については疑問視する報告が多いことから、その作用についてはさらに詳細な検討が必要であろう。

ヒアルロン酸ナトリウムは、角膜上皮創傷治癒を促進することが報告されている。今回の実験でも、ヒアルロン酸群では肉眼的にも組織学的にも上皮再生は良好であった。また、ヒアルロン酸は角膜実質細胞の増殖促進作用を有することが報告されている。今回の実験

でも同様の結果が得られたが、上皮下への異常な角膜実質細胞の集簇所見はみられなかった。すなわち、ヒアルロン酸は角膜実質における生理的な創傷治癒過程を促進するものと考えられ、これにはヒアルロン酸の上皮再生促進作用による早期の上皮再生が関与している可能性がある。臨床的にもエキシマレーザー表層角膜切除において上皮欠損の生じるPRKよりも上皮欠損のないlaser *in situ* keratomileusis (LASIK)の方が術後の上皮下混濁の発生が少ないとされ、実際に上皮の存在の有無が実質の創傷治癒に影響を及ぼすと報告されている。このように術後早期の上皮再生が実質混濁に及ぼす作用についてはさらなる検討を要する。

ジクロフェナクは、抗炎症作用を呈し、角膜手術後の消炎と疼痛軽減目的などに用いられている。ジクロフェナクはステロイドとならんで*in vitro*において角膜実質細胞の増殖を抑制する。しかし、今回の実験ではジクロフェナク群では角膜創傷治癒が遅延しており、炎症細胞浸潤が著しく、血管新生と一部にretrocorneal membraneが認められた。Retrocorneal membraneの起源としては、角膜内皮細胞、実質細胞、隅角部からの線維芽細胞などが考えられることから、ジクロフェナク群では組織障害がかなり重篤で遅延化しており、治癒機転として惹起された障害部周辺の細胞の遊走増殖が著しかったことが推定される。また、今回の実験結果ではジクロフェナク群では上皮再生が遅延していたことから、上皮再生の遅延が実質における炎症の遅延化の要因である可能性も考えられる。

【まとめ】

以上の結果から、家兎表層角膜切除後の創傷治癒過程において、トラニラスト、リン酸ベタメサゾンは、実質細胞の増殖およびコラーゲン産生を抑制することにより上皮下混濁を抑制すると考えられた。また、ヒアルロン酸ナトリウムは、早期に上皮を再生させることにより実質における生理的な創傷治癒過程を促進し、上皮下混濁を抑制するものと推察された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1840 号	氏 名	谷 恵美子
論文題目	Effects of Various Eye Drops on Corneal Wound Healing after Superficial keratectomy in Rabbits 家兎表層角膜切除後の創傷治癒に及ぼす 各種点眼薬の影響		
審査委員	主 査 根 本 昭 副 査 奥 村 勝彦 副 査 古 田 盛		
審査終了日	平成 14 年 2 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

近年普及しつつあるエキシマレーザー表層角膜切除術後には上皮下混濁がほぼ必発し、軽度のものは消退するが重篤な例では恒久的な視力障害が残存する。その病態はメスによる機械的な表層角膜切除後に現れるのと同様の非特異的变化であるとされている。角膜創傷後に生じる角膜混濁の原因は、無秩序に過剰増殖した角膜実質細胞が産生するコラーゲンなどの細胞外基質の異常な蓄積によるものとされている。

表層角膜切除後には、消炎、疼痛軽減、上皮再生促進などの目的で、ステロイド、非ステロイド性消炎薬、ヒアルロン酸などの種々の点眼薬が用いられる。また最近、トラニラストがエキシマレーザー表層角膜切除術後の上皮下混濁の発生を抑制するとの報告がある。しかし、これらの点眼薬の角膜創傷治癒に及ぼす作用を組織学的に詳細に検討した報告は少ない。本研究は、家兎を用いてこれら点眼薬の表層角膜切除後の創傷治癒に及ぼす影響について、特に上皮下混濁の発生に関与する実質細胞の増殖とコラーゲン産生に及ぼす作用に焦点を当て、組織学的に検討したものである。

家兎20匹40眼を用い、麻酔の後、円鋸刃を用いて角膜中央部に直径6mmの表層角膜切除を行った。家兎を5群に分け、術直後から、0.5%トラニラスト、0.1%リン酸ベタメゾンナトリウム、0.1%ヒアルロン酸ナトリウム、0.1%ジクロフェナクナトリウム、生理食塩水（対照）の点眼を1日3回行った。

術後1、2、3、4週後に前眼部所見を観察し、メチレンブルー染色により上皮欠損の有無を確認後、家兎を安楽死させ角膜を摘出した。角膜を中央部で半割し、ただちに一方の角膜片は ^3H -チミジンもう一方の角膜片は ^3H -プロリンにて標識した後、オートラジオグラフィに供した。

各薬剤の角膜実質細胞の増殖に及ぼす作用を検討するため、 ^3H -チミジンオートラジオグラフィにおいて、各群5切片について1切片当たりの ^3H -チミジン取り込み角膜実質細胞の総数を計測し、対照群と各群との有意差検定をDunnettの方法により行い、 p 値 <0.05 を有意とした。角膜実質細胞によるコラーゲン産生に及ぼす作用については、 ^3H -プロリンオートラジオグラフィの光学顕微鏡写真を撮影し、 ^3H -プロリン取り込み角膜実質細胞

の細胞質における銀粒子の密度を写真の上で肉眼的に比較検討した。

創部の混濁は、対照群とジクロフェナク群において術後3週目頃から肉眼的に混濁が顕著となり、4週目には高度の混濁が生じた。トラニラスト群、ヒアルロン酸群でも4週目に軽度の創部混濁を認めたが、その程度は対照群に比して抑制されていた。ベタメサゾン群では4週目でも創部混濁は極めて僅かであった。

組織学的観察においては、対照群では上皮下への角膜実質細胞の集簇所見及び活発なコラーゲン産生を示唆する所見があったが、ベタメサゾン群、トラニラスト群では実質細胞の増殖抑制、コラーゲン産生抑制所見を認めた。一方、ヒアルロン酸群では角膜実質細胞の増殖は対照群に比し促進されていたが、上皮下への実質細胞の異常な集簇所見はなく、実質細胞によるコラーゲン産生は対照群と同等であった。ジクロフェナク群では炎症所見が強く、創部の浮腫と炎症細胞浸潤が著明であった。また、内皮後面にretrocorneal membraneの形成もみられた。

組織片10mm当たりの³H-チミジン取り込み角膜実質細胞数は、対照群に比して1%の危険率でヒアルロン酸群では有意に増加しており、トラニラスト群、ベタメサゾン群およびジクロフェナク群では有意に減少していた。

以上の結果から、家兎表層角膜切除後の創傷治癒過程において、トラニラスト、リン酸ベタメサゾンは、実質細胞の増殖およびコラーゲン産生を抑制することにより、また、ヒアルロン酸ナトリウムは、早期に上皮を再生させ実質における生理的な創傷治癒過程を促進することにより、上皮下混濁を抑制するものと推察された。

本研究は、表層角膜切除後に上皮下混濁の発生抑制の目的で点眼されるトラニラスト、リン酸ベタメサゾン、ヒアルロン酸ナトリウム、ジクロフェナクについて、その実質細胞の増殖とコラーゲン産生に及ぼす作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった組織学的所見の詳細な検討について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。