

論文の内容の要旨

論文題目 角膜感染症の病態と治療の検討

氏名 木枕光木子

要旨

角膜感染症は重篤な視機能障害を生じうる眼疾患だが、病態について不明点も未だ多い。抗微生物薬や角膜移植による治療にも問題点が残されている。そこでそれらの検討を行った。

まず病態に関し、他臓器の感染や炎症では重要性が示されているシンデカン 4 の角膜における関与を検討した。*In vitro* ではまずヒト初代培養角膜上皮細胞、不死化角膜上皮細胞を無血清培地にて培養しシートを作成後 IL1 β による炎症負荷をかけ、炎症負荷時のシンデカン 4 の濃度変化を ELISA 法にて測定した。次にヒト初代培養角膜上皮細胞により作成したシートを用いて、炎症負荷時にシンデカン 4 を加えることにより炎症性サイトカインの発現がどうなるかリアルタイム PCR(rtPCR)により測定した。さらにヒト不死化角膜上皮細胞にてシンデカン 4 を siRNA によりノックダウンし、炎症負荷時の炎症性サイトカインの発現がどうなるか rtPCR により測定した。又、*in vivo* ではシンデカン 4 ノックアウト(KO)マウスを用いてリポポリサッカライド(LPS)角膜実質注射によるグラム陰性菌感染角膜炎モデルで炎症性サイトカインの発現がどうなるか rtPCR により測定した。さらに臨床検体からの検討では、293 眼から採取したヒトの涙液を用いて涙液中のシンデカン 4 濃度を測定した。

結果は、まず *in vitro* ではヒト初代培養角膜上皮細胞シート、不死化角膜上皮細胞シート両者において無刺激群よりも IL1 β 刺激群で有意にシンデカン 4 が増加した。炎症刺激時にシンデカン 4 の前投与を行うと無添加群よりも IL6, FGF2, PDGF α が有意に発現低下し、シンデカン 4 ノックダウンを行うと IL1 β 刺激時の IL6, IL1 β といった炎症性サイトカインの発現が有意に増加した。*In vivo* ではシンデカン 4 ノックアウトマウスで野生型マウスよりも炎症刺激時における IL6, IL1 β , SULF1 の発現が増加した。ヒト涙液の検討において、正常眼 21 眼(平均年齢 58 \pm 20.9 歳)において涙液中シンデカン 4 の濃度と年齢との相関をみると、相関係数は 0.59(P=0.004)と正の相関関係が認められた。疾患群別涙液中シンデカン 4 濃度について Steel-Dwass 法にて多重比較検定を行ったところ、統計学的に有意差は認めなかった。PKP 後患者群においての複数回採取可能であったデータも含めた 57 眼の検討では、PKP 術後経過期間とシンデカン 4 濃度の間に有意な相関関係は見られなかった。術後経過の追えた 3 眼の感染症眼(細菌性、真菌性、ウイルス性感染症 1 眼ずつ)において涙液中シンデカン 4 の濃度は病勢が落ち着いてくるにつれ上昇する傾向がみられた。結論としては、シンデカン 4 が炎症刺激により発現増加し炎症抑制に働いているのではないかと示唆された。シンデカン 4 はグラム陰性菌感染で発現増加し IL1 β や IL6 といった炎症性サイトカインの発現を抑制することで、好中球の角膜内浸潤を防ぐ可能性が推察された。肺炎患者のように角膜感染患者においてもシンデカン 4 重症度のバイオマーカーになるかについては、残念ながら本検討では結論が得られず、今後さらなる詳細な検討が必要と考えられた。

次に抗微生物薬治療の問題点の一つである角膜上皮細胞への毒性につき抗真菌薬を対象に検討した。角膜感染症の治療では、その抗菌スペクトルや抗菌力などの抗微生物作用が重要であるが、臨床上その抗微生物点眼薬による角膜に対する毒性もしばしば問題となる。抗真菌薬点眼剤で現在日本の調剤薬局で手に入るものは一つしかなく、様々な自家調整薬を用いて角膜真菌感染症の治療に当たっているが、角膜上皮細胞に対するそれらの毒性プロファイルは知られていない。そこで自家調剤製剤を含め 4 種類の抗真菌薬点眼剤の毒性評価を行った。重層化したヒト角膜上皮細胞シートモデルを用いて *in vitro* で 4 種類の抗真菌薬の点眼毒性を比較した。ヒト角膜上皮細胞シートを無血清培地で培養し、0.1%ミカファンギン、1%ポリコナゾール、0.1%ピマリシン、0.1%アムホテリシン B 培養液に添加し負荷実験を行った。ミカファンギンとポリコナゾールは生理食塩水で希釈し、アムホテリシン B は製造元の指示に従い 5%グルコース溶液を溶媒とした。よって生理食塩水と 5%グルコース溶液をコントロールとして用いた。Cell viability を WST-1 assay で、バリア機能を carboxyfluorescein permeability assay で、Cell migration を wound healing assay で計測した。

結果は WST-1 assay においてはポリコナゾール、ピマリシン、5%グルコース溶液、そしてアムホテリシン B の点眼により生理食塩水と比較し有意に viability が低下し、アムホテリシン B の点眼により 5%グルコース溶液と比較し有意に viability が低下した。carboxyfluorescein permeability assay においてはピマリシン、アムホテリシン B により生理食塩水と比較し有意にバリア機能が悪化した。5%グルコース溶液では生理食塩水と比較し有意にバリア機能が良好であった。アムホテリシン B の点眼により 5%グルコース溶液と比較し有意にバリア機能が悪化した。wound healing assay においてはピマリシン、アムホテリシン B により生理食塩水と比較し有意に創傷被覆が遅延し、5%グルコース溶液と比較した場合も有意に創傷被覆が遅延した。

結論としては、ミカファンギン、ポリコナゾールは角膜上皮への毒性が少なく安心して使用できると考えられた。抗菌作用のみならず、角膜上皮細胞への毒性が評価されたことで、例えば真菌増殖が著しい段階では抗菌効果を優先し、回復過程においてはより毒性の少ない製剤を選択するなど、病期に応じた治療薬選択に有益な情報になると考えられる。

さらに角膜感染症は重篤な場合外科的治療として角膜移植が必要となることがあるが、近年フェムトセカンドレーザー (FSL) による手術が期待されている。今回の研究では FSL による角膜深層実質切開後の角膜実質切断面の平滑性および内皮障害を評価した。150 kHz フェムトセカンドレーザーを用いて、豚眼の角膜の表面から 100、300、または 500 μm の深度で角膜実質を切開した。角膜実質切断面の平滑性を光学顕微鏡使用と走査電子顕微鏡使用画像から評価した。兎眼角膜は、残角膜厚が 70、100、または 150 μm になるよう切断し内皮障害を染色した画像を元に評価した。さらに残角膜厚が 100 μm の際にレーザースポット間距離 (2 または 4 μm) やフラップ剥離の影響を検討した。

結果は切断深度の誤差は 15 から 28 μm と小さく精度が高いことが確かめられた。角膜内皮障害

はは残角膜の厚が 70 μm の群で 150 μm の群より大きかった。レーザースポット間距離 4 μm ではフラップを剥離した群でより内皮ダメージが大きかった。

結論としては、残角膜厚が 70 μm 未満である時に角膜内皮傷害が増大した。又残角膜厚が 100 μm である時には、レーザースポット間距離 4 μm の場合フラップ剥離により角膜内皮障害が増大した。よってこの条件を避けることで、角膜内皮細胞への影響を最小限とした移植片が作製可能と考えられた。より低エネルギーでの照射が可能な機械も開発されており、今後このような技術の進歩とともに、さらに高精度な角膜移植術の実現に期待がかかる。

角膜感染症については病態の解明についても、治療法についても現在さらに進歩している分野である。今後も角膜感染症に対し一つ一つ検討を重ねていくことで、一人でも多くの人々がこの重篤な疾患による失明から救われることを願っている。そして本研究が将来臨床応用され、その一助となれば幸いである。