

治療用コンタクトレンズの適応と
上手な使い方

国立病院機構東京医療センター感覚器センター 山田昌和

問題提起

治療用コンタクトレンズ(CL)といっても素材やデザインは通常のソフトレンズと基本的に同じである。正常者にも推奨されない連続装用を角膜障害のある眼に行うわけであり、一定のリスクを伴う治療法といえる。治療用CLを装用させるにはリスクを上回るベネフィットがなければならない。どんな場合に何を目的として使うのがよいのだろうか。

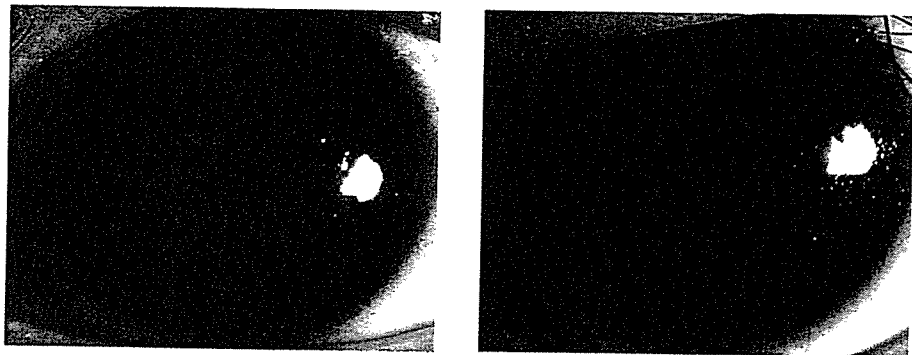


図1 格子状角膜ジストロフィに伴う上皮びらんの症例を治療用CLで治療する前と1週間後

解説

a 治療用CLを装用させるのは何のため？

治療用CLを使う場合には、とりあえず使ってみるというのではなく、何の目的で使うのか意識的であることが重要である。

治療用CLには、

- ① 上皮の脱落を抑制することによって創傷治癒を促す、
 - ② 上皮を物理的に保護することで、びらんや上皮障害の発症を予防する、
 - ③ 上皮障害に伴う痛みや異物感を軽減できる、
 - ④ 角膜上皮障害による視力低下を改善できる、
- などがあげられる。このうち、①と②が主要な目的であることが多いが、目的が複数重なることもあり、実際に複数の効果をもたらされることがある。

b 治療用CLによって上皮障害を治療する

1例として、緑内障点眼剤による薬剤起因性角膜上皮障害の症例を示す。60歳代の女性で、強い上皮

障害のために初診時には矯正視力が0.1まで低下していた。この症例では、点眼薬を人工涙液のみにするとともに、①の上皮細胞の脱落を抑制して修復を促進する目的でシリコンハイドロゲルレンズを連続装用させた。レンズの装用によって異物感の軽減と視力の回復(装用直後に0.4まで)も得られ、上皮障害が改善した1か月後の時点では視力は0.7となり、上皮は点状表層角膜症が若干残る程度に持ち込むことができた。

この症例は、本質的には薬剤毒性による上皮の脱落の亢進と疲弊があり、修復機転が十分に働いていない状態である。緑内障点眼薬を一時中止してマイナス要因を除去するとともに治療用CLで上皮の脱落を抑制して修復を促すのが治療の基本方針となった。しかし、治療用CLの作用である、③の上皮障害に伴う痛みや異物感の軽減、④の角膜上皮障害による視力低下の改善、の2つも同時にもたらされ、しかもこれは装用してすぐに発揮された。

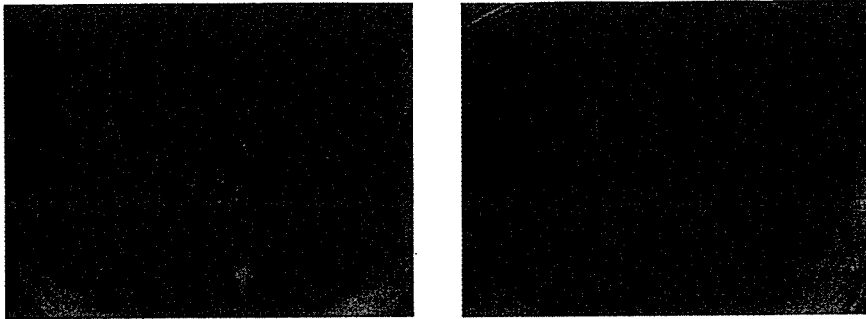


図2 緑内障点眼薬による薬剤起因性上皮障害の治療用CLによる治療の前後

痛みの軽減と視力の回復は、患者へのとりあえずの福音となるために治療を受けるモチベーションの向上にもつながりやすい。治療用CLのよい適応となる上皮障害としては、遷延性上皮欠損、難治性の点状表層角膜症、糸状角膜炎などがあげられる。

c 治療用CLによって上皮障害を予防する

CLにより上皮を物理的に保護することで、びらんや上皮障害の発症を予防できるのも大きなメリットとなる。再発性上皮びらんで用いる場合が代表的であるが、水疱性角膜症や帯状角膜変性、スフェロイド変性などにも適応の場合がある。ただし、帯状角膜変性、スフェロイド変性で凹凸が著しいと装用困難なこともあり、注意したい。

こうした予防的治療の場合には、CL装用に伴う異物感、違和感があるので、メリットがデメリットを上回っているかどうか慎重に判断していくことが重要となる。

d 治療用CLにはリスクが伴う

治療用CLは基本的に連続装用ベースで用いられるので、一定のリスクを伴う治療法である。上皮障害の増悪、感染症の誘発、レンズの脱落とこれに伴う急性増悪などが主なものとしてあげられ、患者にもリスクについて話しておく必要がある。

用いるレンズは酸素透過性が高く、汚れにくいレンズが望ましい。筆者は以前はブレスオーのプレーノレンズを使用していたが、最近は使い捨てレンズかシリコンハイドロゲルを用いている。装用期間は1週間、最長でも2週間として、新しいレンズと交換している。

装用を開始した当初は3~7日後に診察して、レンズの汚れや位置をチェックしておく。ドライアイなどでレンズの装用が困難な場合には、涙点プラグを入れて涙液量を増やす必要がある。

解決策

- ① 治療用CLはリスクを伴った治療法である。何のために使いたいのか目的意識をはっきりもとう。
- ② レンズは、使い捨てレンズかシリコンハイドロゲルを用いる。連続装用の期間は1週間として、毎回新しいレンズと交換する。
- ③ できるだけこまめに診察して合併症を早めに察知しよう。

感染性角膜炎の初期治療： どの段階で紹介する？

国立病院機構東京医療センター感覚器センター 山田昌和

問題提起

感染性角膜炎は最も重篤な前眼部疾患の一つである。適切な治療がなされないと感染巣は拡大し、角膜穿孔に至ることや、癍痕性の混濁を残すことがある。起因菌の検索結果が出るには時間がかかり、しかも検出率は必ずしも高くない。

ここでは効率のよい初期治療と、初期治療が奏功しない場合の対処法について考えてみよう。

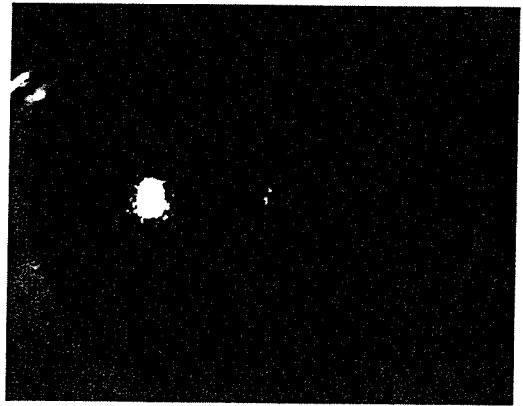


図 1

解説

a 感染性角膜炎のバックグラウンドをおさえておこう

感染性角膜炎の発症要因と起因菌などバックグラウンドについておさらいしてみよう。

健常な眼に感染性角膜炎を生じることはまれである。健常な角膜上皮はバリアとして作用し、涙液にはIgAやラクトフェリン、分泌型フォスホリパーゼA2など感染防御に働く蛋白が含まれているためである。

感染が成立するには眼表面の防御機構が破綻する必要がある。感染性角膜炎には発症の誘因が存在することが多い。誘因としては、角膜基礎疾患(ドライアイや睫毛乱生、角膜移植眼など)や外傷が重要であるが、なんといっても最大の誘因はコンタクトレンズ(CL)である。筆者の統計では、感染性角膜炎の約半数がCLを基盤としている。

起因菌として重要なものとして、表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、緑膿菌、モラクセラ、真菌があげられ、CLを誘因とするものではアカントアメーバやpropionibacterium acnesなどがこれに加わる。最近、米国ではフサリウムという真菌感染の多発が問題となっている。

このように感染性角膜炎の起因菌は多彩で捉えどころがないようだが、頻度と傾向を把握しておくことは重要である。頻度として、表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌を中心とした細菌感染が多く全体の80~90%を占め、残りの数%ずつが真菌かアメーバと覚えておくとよい。

真菌のうち糸状菌は外傷を誘因とするものに多く、カンジダに代表される酵母菌は角膜移植眼やCLに多い。また、アメーバ感染はCL装用者にほぼ限定して生じる疾患であり、使い捨てレンズも例外でないことを知っておく必要がある。

b 起因菌の同定や推測はむずかしい

感染性角膜炎の診断には起因菌の同定ができればいいことはないが、開業のクリニックで塗抹標本をみることはむずかしいであろうし、細菌培養検査を外注するにしても結果が返ってくるには時間がかかる。

一方、スリット所見から起因菌を特定することも決して容易ではない。感染性角膜炎では、緑膿菌の輪状膿瘍、アカントアメーバの放射状神経角膜炎のように特徴的な所見を呈することもあるが、これら



図2 フルオロキノロン耐性緑膿菌による感染性角膜炎



図3 カンジダによる感染性角膜炎

は病期を通じて出現するわけではなく、図1の写真のような初期像から起病菌を特定するのはむずかしい。

そこで、診断がつかない状態で、とりあえず初期治療を開始することになるわけだが、ここで重要になってくるのは前述した感染性角膜炎の起病菌の頻度である。重複になるかもしれないが、ブドウ球菌を中心とした細菌感染が多いこと、誘因の種類によって考慮すべき起病菌が加わってくることをおさえておこう。

c 初期治療：何をどう使うか？ 効果の有無の判定は？

初期治療では、細菌を幅広くカバーすることが先決であり、βラクタム系とアミノ配糖体系の併用療法かフルオロキノロン単剤による頻回点眼を処方する。

筆者は1時間ごとの点眼を指示しており、1日3～4回の中途半端な回数は指示しない。ステロイド剤や非ステロイド系抗炎症剤の点眼は病勢をマスク

するので処方しない。抗生物質の内服は角膜への薬剤移行を考えると意義が少なく、筆者はほとんど用いていない。

βラクタム系とアミノ配糖体系の併用療法かフルオロキノロン単剤による頻回点眼の奏成功率は80～85%である。効果が出るか出ないかは3日で判定できる。充血や痛み、前房内炎症などの所見が軽快してくれば治療を継続し、場合によってはステロイド剤や非ステロイド系抗炎症剤の点眼を追加してもよい。

問題は奏功しない場合であるが、この場合には薬剤耐性菌、真菌、アメーバの三つが考えられる。これらの起病菌の治療に用いる薬剤は、点眼薬の自家調整が必要となるので、専門医のいる医療施設に紹介したほうがよいかもしれない。

図2、3はどちらもフルオロキノロンの初期治療に反応しないので、紹介された症例である。治療を開始して3日、遅くとも1週間で改善傾向がなければ専門医療機関への紹介を考慮しよう。

解決策

- ① 感染性角膜炎の起病菌は細菌が90%程度、残りの数%ずつが真菌かアメーバ。誘因によって多少異なることをおさえておこう。
- ② 初期治療はβラクタム系とアミノ配糖体系の併用療法かフルオロキノロン単剤による頻回点眼とし、2～3日経過をみる。
- ③ 初期治療の奏成功率は80～85%と最初に患者に伝えておく。だめな場合は薬剤耐性菌、真菌、アメーバの三つが考えられるので厄介である。専門医に紹介しよう。

前眼部疾患と両眼視

POINT

- ① 癬痕性角結膜疾患や翼状片では原発性に眼球運動障害を引き起こすことは少ない。
- ② 角結膜疾患の術後や再発性翼状片では眼球運動障害による複視が問題となることがある。
- ③ 角膜移植後の両眼性複視では、廃用性斜視、潜在性の斜視の顕性化、手術時の外眼筋損傷などの要因を考慮する。

はじめに

前眼部疾患は両眼視とあまり関係ないと思われがちである。しかし、角膜混濁で長期間にわたって片眼の視力低下が続くと廃用性斜視を生じたり、翼状片や癬痕性角結膜疾患で眼球運動が障害されたりと両眼視の知識を基にした対応が必要となる場面も少なくない。また、前眼部手術によって麻痺性斜視や眼球運動障害を引き起こすこともある。ここでは、角結膜疾患による眼球運動障害の問題と角膜移植や白内障手術後の複視の問題について概説する。

1 角結膜疾患と両眼視

1) 角結膜疾患の両眼視検査

角結膜疾患で両眼視異常をきたす場合、その多くは眼球運動障害とこれに伴う複視が問題となってくる。感覚面というより運動面の問題であり、むき眼位によって複視の程度が変わることになる。したがって、検査として重要なのはHess赤緑試験と両眼注視野である。もし回旋性の複視がある場合には、回旋偏位もむき眼位によって変化する可能性が大きいので、大型弱視鏡検査が有用である。

2) 癬痕性角結膜疾患では眼球運動障害は意外に起きにくい

Stevens-Johnson症候群や眼類天疱瘡に代表

される癬痕性角結膜疾患では、意外なほど複視の訴えは少ない。どちらも頻度の高い病気ではないので症例の絶対数が少ないこと、高度の視力障害を伴う例が多いので複視という訴えになりにくいことなどが要因として考えられるが、それだけではなさそうである。

ある眼類天疱瘡患者の前眼部写真を図1に示す。両眼ともに結膜囊短縮と瞼球癒着が著明であるが、角膜の病変は軽度であり、両眼ともに1.0の視力が保たれている。この患者にHess赤緑試験と両眼注視野を施行してみたところ、全く異常がなかった。眼球運動は正常という解釈もできるが、眼球は上下方向には動きにくい、病変が両眼性であるためにHeringの法則でそれなりに釣り合いが取れているという解釈もできる。この症例では、右眼に癬痕性眼瞼内反が生じており、睫毛による強い異物感を訴えるために、羊膜移植を用いた結膜囊形成術を右眼の下方に施行した(図2)。術後しばらくして、Hess赤緑試験と両眼注視野を再施行したところ、やはり正常範囲であった。つまり、癬痕性角結膜疾患では意外なほど眼球運動障害は起きにくいということになる。

癬痕性角結膜疾患は基本的には粘膜の疾患であり、結膜下の線維性組織の増殖を伴っているにしても外眼筋附着部よりも前方で生じているためと推測される。実際に、こうした症例で眼表面再建術を行った場合に、外眼筋よりも後方

はきれいで特に所見がみられないことが多い。逆にいえば、眼表面再建術であり奥まで追いつすぎると、かえって術後に眼球運動障害をきたす可能性があることを示すものと思われる。

3) 再発性翼状片では眼球運動障害が生じやすい

癥痕性角結膜疾患で述べたことは翼状片にも当てはまりそうである(図3)。初発の翼状片では眼球運動障害を伴うことはまずない。翼状片の幅の広い症例や瞳孔縁にかかる症例でも視力障害を訴えることはあっても、両眼性複視は生じないのが普通である。翼状片の原因が結膜上皮にあるのか、結膜下組織にあるのかは議論があり確定されていないが、いずれにしても線維性組織の増殖は内直筋を巻き込まず、結膜自体の伸展性も保たれているためと思われる。

ところが、再発性翼状片では様相はかなり異なってくる。図4は図3に示した症例の術後で、pyogenic granulomaのような形で再発した例である。内直筋の付着部付近にまで肉芽が及んでおり、結膜の伸展性も失われているために外転制限があり、側方視時の複視が生じている。この例のように再発性翼状片で複視が生じる場合、正面は正位で患眼の外転時に複視が生じることが多い。ただし、重症例では正面視でも患眼が内斜することもある。逆に、まれではあるが、翼状片の手術後に内転障害や外斜視を生じることがある。翼状片手術時に内直筋を損傷したために生じる眼球運動障害である。内直筋の付着部は輪部から約5mmと近いので、結膜下の増殖組織を切除する際にあまり深追いすると内直筋を損傷しやすいので注意したい。内直筋周囲の線維組織の増殖が著明な場合には内直筋に斜視鉤をかけて確保した状態で癒着剝離を進めるとよい。

図4の症例では肉芽組織の切除と内直筋周囲の癒着剝離を行った後に羊膜移植と自己結膜移植を行って、再発を防止するとともに眼球運動障害の改善を図った(図5)。再発性翼状片では外眼筋手術(この場合は内直筋の後転)を行わ

なくても、癥痕組織の除去と癒着剝離を十分に行えば、眼球運動障害も消失することが多い。

2 前眼部手術と両眼視異常

1) 角膜移植術後の「両眼性」複視

角膜移植を行っているとき、術後に複視の訴えを聞くことがしばしばである。術後視力が1.0でていると術者は喜ぶが、患者からは「いくつも見えている輪の中から見えたものを選んで答えているだけです」などといわれたりする。これは角膜移植後の角膜形状は正常角膜と大きく異なっており、不正乱視が避けられないためである。こうした事情から、角膜移植後の複視の訴えは聞き流しがちであるが、時に「両眼性」複視のことがある。この場合には大きく分けて3つのパターンがある。以下、自験例をもとにパターンを示す。

☉ パターン1：廃用性斜視

5歳頃から右眼にヘルペス性角膜炎による角膜混濁がある症例。術前視力は右眼(0.03)、左眼(1.2)で、廃用性と思われる右眼外斜視を認めた。21歳時に全層角膜移植を施行し、視力は(0.8)まで改善したが、複視を生じるようになった。右眼水平筋の前後転術を施行して、眼位を矯正すると複視は消失した。視力改善に伴って廃用性斜視による複視が生じた例である。

☉ パターン2：斜視の顕性化

先天性梅毒による角膜実質炎の症例で、白内障の進行とともに視力低下が増悪して受診した症例。70歳の初診時に視力は右(15cm手動弁)、左(0.02)で、約2年の間隔をおいて両眼に角膜移植トリプル手術を施行したところ、回旋性の複視を訴えるようになった。約10°の外方回旋偏位があり、上下偏位はなかったことから両眼の上斜筋麻痺と診断し、両眼の下直筋鼻側移動術を施行したところ複視は改善した。よく話を聞くと以前から複視を生じることがあったということで、先天上斜筋麻痺が疑われた。視力改善に伴い以前から存在した眼位異常が顕性化したものと考えられる。

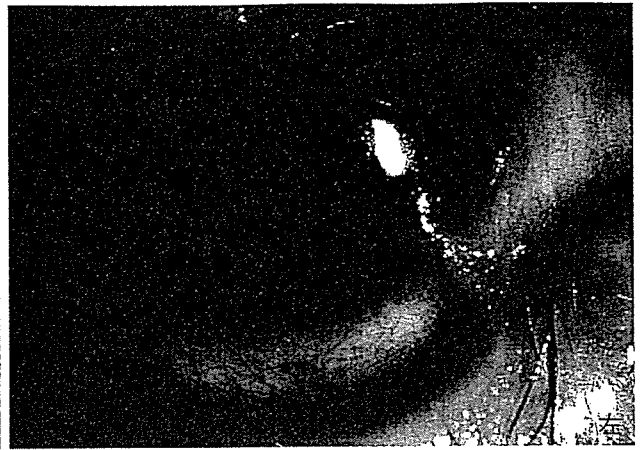
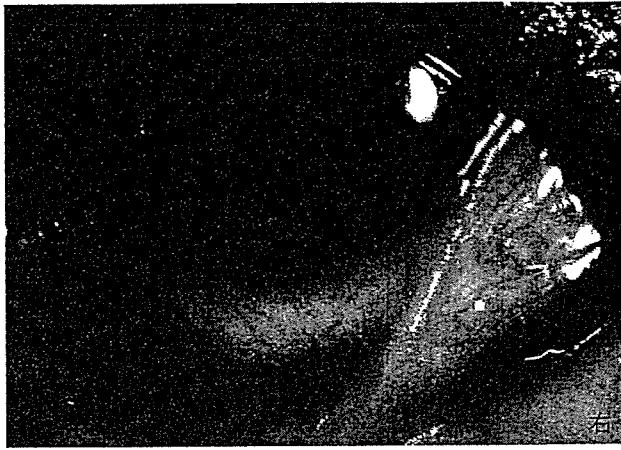


図1：眼類天疱瘡患者の前眼部所見

両眼ともに結膜嚢短縮と瞼球癒着が著明であるが、眼球運動障害はない。

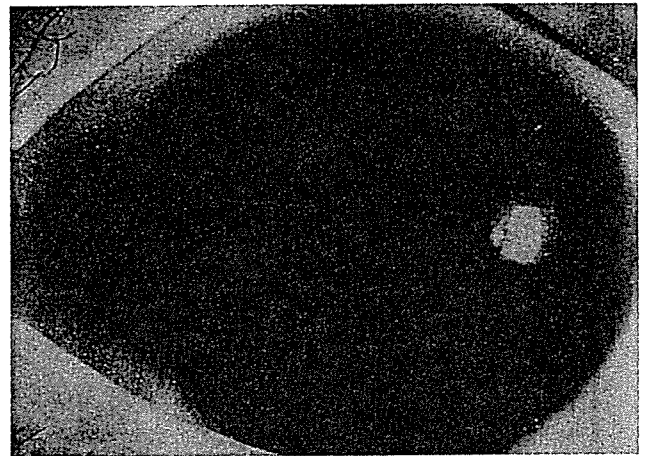


図2：図1の症例(右眼)の羊膜移植による結膜嚢形成術後

下方の瞼球癒着のみを解除した形だが、術後も眼球運動障害や複視は生じなかった。

図3：翼状片(初発例)

原発性の翼状片で眼球運動障害をきたすことはまずない。

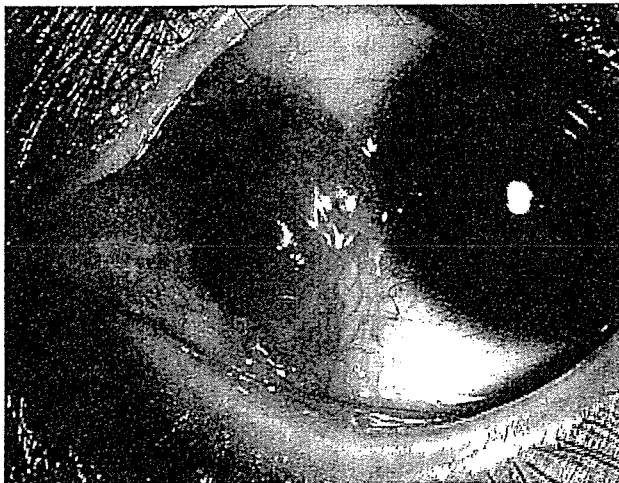


図4：再発性翼状片

図3の症例の術後に生じた再発性翼状片で、外転制限を伴うようになった。

図5：図4の症例の再手術後

羊膜移植と自己結膜移植を行い、再発を防止するとともに眼球運動障害の改善を図った。

☺ パターン3：手術，麻酔による眼球運動障害

両眼の角膜実質炎で，右眼の混濁が強い症例。術前視力は右(0.2)，左(0.8)で75歳時に右眼の角膜移植トリプル手術を施行したところ，術後に右眼の上転障害による複視を訴えるようになった。左眼の上直筋後転術を施行し，複視はほぼ消失した。球後麻酔または上直筋にかけた牽引糸による外眼筋の損傷が疑われる症例である。

以上のように角膜移植後の「両眼性」複視は，廃用性斜視，潜在性の斜視の顕性化，手術時の外眼筋損傷など様々な要因により生じる。各々で対処や予後が異なるので，要因を見極めることが大切である。

2) 白内障術後の複視

前述した角膜移植後の複視の問題は，手術症例数の多い白内障ではより大きな問題となる。白内障は厳密に言えば前眼部疾患ではないが，問題はほぼ共通しているのでここで述べておきたい。

白内障術後の複視の原因は，角膜移植であげた3つの要因，廃用性斜視，潜在性の斜視の顕性化，手術時の外眼筋損傷に加えて，眼内レンズの位置異常の4つがあげられている。その頻度は0.7~2.0%程度と報告されており，要因として大きいのは手術時の外眼筋の損傷である。

白内障手術の麻酔法として球後麻酔が行われ，上直筋に制御糸をかけるのが普通であった時代には，球後麻酔による下直筋や下斜筋の損

傷，上直筋の損傷が要因として注目されていた。テノン嚢麻酔が中心となった現在でも，上直筋を障害したと思われる症例が散見されるが，点眼麻酔では(当然のことだが)外眼筋を損傷することはない。

👉 おわりに

以上，述べてきたように，前眼部疾患では原発性に両眼視異常をきたすことは少ない。両眼視異常は手術後にあらわれることが多く，瘢痕性角結膜疾患や翼状片の術後には眼球運動障害による複視が問題となることがある。また，角膜移植後の複視では，廃用性斜視，潜在性の斜視の顕性化，手術時の外眼筋損傷などの要因を考慮する。

山田 昌和

📖 参考にするとよい文献

- ① Shimazaki J, Kosaka K, Shimmura S, et al : Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology* 110 : 119-124, 2003
- ② Catalano RA, Nelson LB, Calhoun JH, et al : Persistent strabismus presenting after cataract surgery. *Ophthalmology* 94 : 491-494, 1987
- ③ Wylie J, Henderson M, Doyle M, et al : Persistent binocular diplopia following cataract surgery : aetiology and management. *Eye* 8 : 543-546, 1994
- ④ Yanguela J, Gomez-Arnau JI, Martin-Rodrigo JC, et al : Diplopia after cataract surgery : comparative results after topical or regional injection anesthesia. *Ophthalmology* 111 : 686-692, 2004



移植か虹彩付きコンタクトレンズか？

—美容的手術への対応—

国立病院機構東京医療センター感覚器センター 山田昌和

■見た目は「人生」を変える？

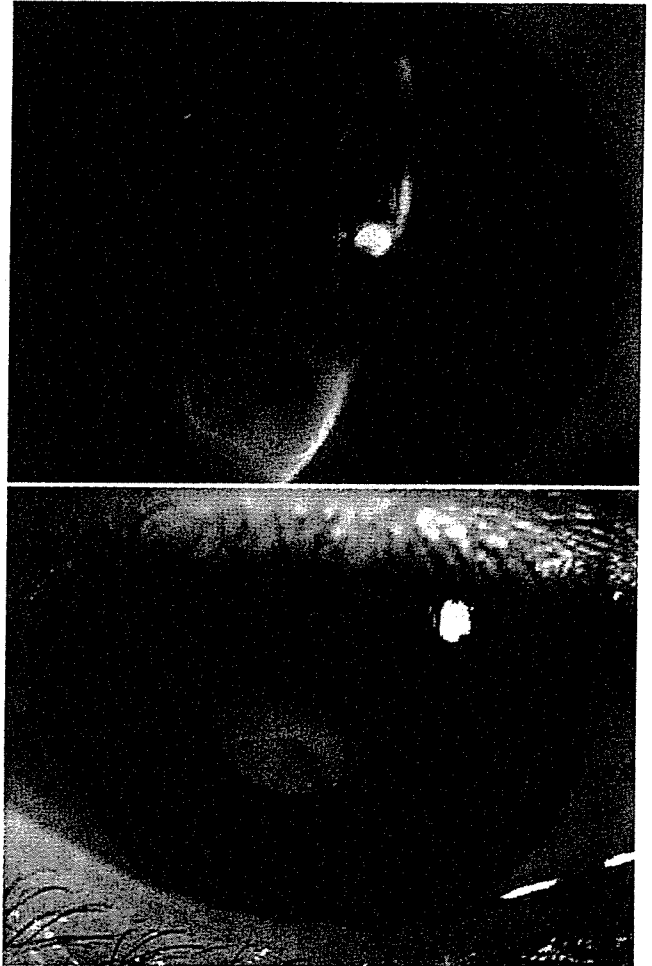
眼疾患には、後眼部疾患のように機能的に大きな損失があっても外見は変わらない場合と、角膜疾患や斜視のように視機能の損失に加えて外見の異常を伴う場合がある。整容的な問題は、実際に醜いかどうかはともかく、精神面への影響が大きい。目は顔の表情、人の印象を形成する大きな要素であり、目の外見異常は患者自身の社会的行動や精神状態、社会生活に影響を及ぼすことは容易に想像できる。実際に斜視の場合、患者の性格に内向的傾向がみられるという報告以外に、就職に不利になる、平均年収が低いなどの傾向が報告されている。さまざまな意味で、見た目は「人生」を変えともいえるわけである。輪部デルモイドや眼瞼下垂の手術などでは視機能の向上にあまり寄与しない場合もあるが、だからといって手術の効用が否定されるわけではない。

角膜混濁によって黒目が白くなっている患者が整容面の改善を期待して眼科を受診することがある。整容面だけでなく視力の改善が期待できる場合は角膜移植の選択がなされるが、問題は視機能の回復が期待できない場合である。どのようなオプションがあり、どのように選択がなされるべきなのだろうか。

■角膜混濁の整容的治療のオプション

角膜混濁を隠すための治療として考えられるのは、虹彩付きコンタクトレンズ、点墨術、義眼、角膜移植である。ただし、点墨術を行うことのできる眼科医の数はきわめて少なくなっており、現実的には選択しにくい。残りは3つになるが、いずれを選択するかは、患眼の視機能、角膜上皮の状態、僚眼の状態などを評価したうえで、それぞれの利点と欠点を患者自身に十分理解してもらったうえで決定することになる。

患眼の視機能の評価法についての詳述は避けるが、もし角膜が完全に透明になったとしたらどの程度の視機能が出ると期待されるか(視機能のポテンシャル)、その視機能を患者自身がどのくらい大切に考えるか、という観点で評価することが重要であ



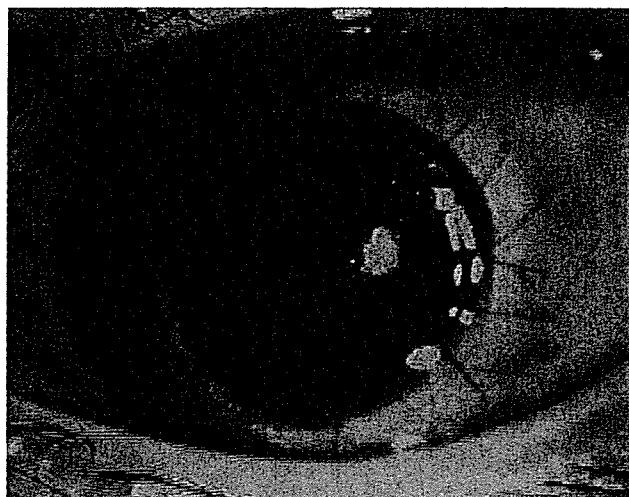
【図1】角膜白斑の症例に虹彩付きコンタクトレンズを処方した例
瞳孔領に混濁が見えているが、整容的には問題となっていない。

る。また水疱性角膜症のように上皮が脆弱な場合には、コンタクトレンズの装用にはリスクが伴うことも考慮する必要がある。義眼の場合には、小眼球や眼球瘻などではそのまま装用できるが、眼球の大きさや形が保たれている場合には装用がむずかしく、眼球摘出術や眼球内容除去術を行う必要があることが多い。

一方、純粹に整容面だけを考えた場合に最も優れているのは、義眼と思われる。次は虹彩付きコンタクトレンズで、角膜移植は整容面だけを考えた場合



【図2】角膜脂肪変性の症例に全層角膜移植を施行した例
耳側の混濁が残存しているが、整容的には一定の満足が得られている。



には最も劣る。視機能を考えた場合には順序は逆になり、角膜移植では視機能の改善が図れる場合があり、虹彩付きコンタクトレンズは視機能を温存できるが、義眼は視機能を考慮しえない。義眼を装用するための眼球を除去する手術には、精神的な抵抗が大きく、患者に受け入れられない場合もある。

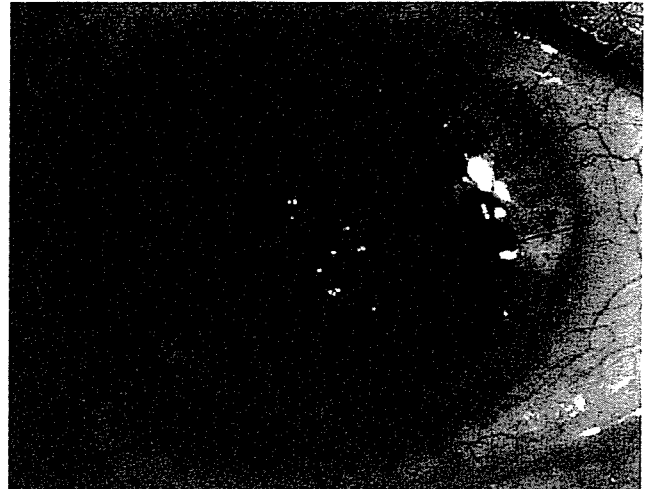
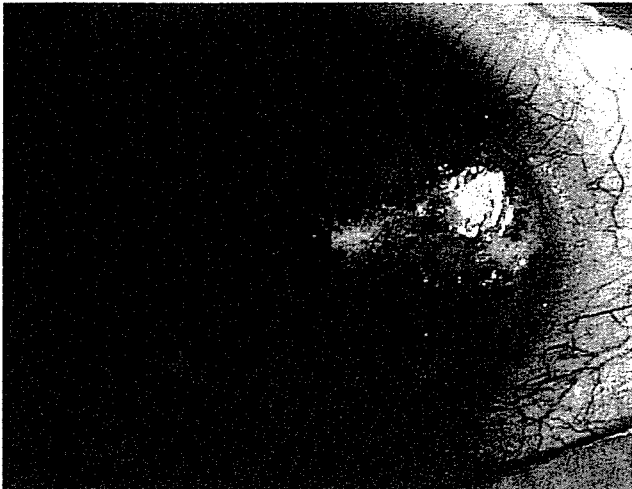
■美容的治療の選択の実際

実際の症例をいくつか供覧する。図1は50歳代の女性で、幼少時の角膜実質炎後の瘢痕性混濁が気になって受診した症例である。角膜下方に白色の混濁があり、虹彩前癒着と瞳孔変形を伴っており、視力は0.08であった。傍眼にも軽い混濁があるが、視力は1.0と正常に保たれている。この症例では角膜移植によってある程度の視力改善が期待できそうであったが、本人は整容面だけの改善を希望したので、虹彩付きコンタクトレンズを処方した。スリット写真では瞳孔領の混濁が見えているが、肉眼的には大きな問題がなく、患者の満足を得ることができている。

図2は20歳代の女性で、もともとは輪部デルモイドの症例である。10代で腫瘍切除術を受けたが、

術後の炎症反応が強かったのか、偽翼状片と脂肪変性による混濁をきたしていた。視力は手動弁だったが、術前は1.0の視力があつたという。この症例では視機能改善の見込みが大きいと思われたので、全層角膜移植を行った。術前はよくわからなかったが白内障があり、視力の改善は得られていないが、術前後で大きく変わったことが一つあつた。この患者は髪が長く、いつも白濁した左眼を髪で隠すようにしていたのであるが、術後は髪をアップにして来院してきたのである。少なくとも整容面とこれに起因する精神面では、角膜移植が大きな威力を発揮したものと推測される。

図3は70歳代の男性で、鉗子分娩による水疱性角膜症の症例である。生下時から黒目が白かつたということで、視力は光覚のみであり、視性刺激遮断弱視のことを考慮すると手術による形態覚獲得は困難と考えられた。角膜径が小さいこともあり、角膜移植では整容面での改善が十分でない可能性が強いこと、ときどき生じる上皮びらんによる痛みがあることなども考慮して、筆者は眼球内容除去を行って義眼とする方法を提示した。しかし、患者自身はこれを受け入れず、角膜移植を強く希望したので、径



【図3】 鉗子分娩による水疱性角膜症の症例に全層角膜移植を施行した例
術前の予想どおり視機能は全く改善していないが、精神的な満足感があるという。

7.5 mmで角膜移植を施行することにした。術後は移植片は透明に保たれているが、やはり視機能の改善は得られず、糸状角膜炎などの合併症のために治療用コンタクトレンズの装用を行うなど必ずしも順調ではない。しかし、本人は術後の結果に満足しているという。「片目が白いことが自分の長年のコンプレックスであり、これを自分の倫理観に反しない方法で改善できた」というのである。

■移植と虹彩付きコンタクトレンズは対立しない

角膜移植の美容的適応という問題について述べてきたが、最後に角膜移植と虹彩付きコンタクトレン

ズは必ずしも対立する概念ではないということもつけ加えておきたい。角膜移植眼は視機能が向上していても、周辺部角膜の混濁や虹彩の変形など整容面での矯正は不十分なことも少なくない。このような場合、虹彩付きコンタクトレンズを処方すると患者自身の満足度が向上することがある。度数を入れることで屈折矯正の効果を同時に得られるメリットもある。見えるようになればそれでよいという考えも一面の真理ではあるが、それ以外の患者の要望にも目を向けていく必要があり、虹彩付きコンタクトレンズも角膜専門医のデバイスとして身につけておきたいものの一つである。

[12] Identification and Analysis of Novel Glycolipids in Vertebrate Brains by HPLC/Mass Spectrometry

By YASUKO NAGATSUKA, HIROMASA TOJO, and YOSHIO HIRABAYASHI

Abstract

Glycosphingolipids are a major component of microdomains or lipid rafts in biological membranes. A new member of raft glycolipids, phosphatidylglucoside (PtdGlc), as well as 6-O-Ac-PtdGlc, a form of PtdGlc O-acetylated at position 6 of its glucopyranose ring, is present in central nervous system tissues. Because the glycolipids represent a minor constituent of lipid rafts and because their mass numbers are the same as that of phosphatidylinositol (PI), the glycolipids are difficult to detect and purify. Here we describe methods to purify and identify glycolipids from rodent brain and methods to discriminate PtdGlc from PI in chick spinal cord using HPLC/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry.

Overview

Glycosphingolipids (GSLs) are ubiquitous in mammalian tissues and are particularly abundant in nervous system tissues. They form aggregates or clusters with cholesterol, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, and acylated proteins (Brown and London, 2000; Simonk and Ikonen, 1997) in biological membranes. GSL-enriched microdomains or rafts in the CNS play important roles in nonreceptor NSrc signaling (Mukherjee *et al.*, 2003), chemotropic axonal guidance of nerve growth cones (Guirland *et al.*, 2004; Herincs *et al.*, 2005), neuron-glia interactions (Schaeren-Wiemers *et al.*, 2004; Vinson *et al.*, 2003), and amyloid precursor protein processing (Kakio *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2005).

Using an anti-blood group "i" monoclonal antibody, Nagatsuka *et al.* (2001) identified a novel glucosylated phosphoglycerolipid in human cord red blood cells. The promyelocytic leukemia cell line HL60 also possesses a similar phospholipid, which we call phosphatidylglucoside (PtdGlc). PtdGlc, which is present in a detergent-insoluble membrane (DIM) fraction, is possibly involved in cellular differentiation.

Its chemical structure, however, has not been fully studied (Nagatsuka *et al.*, 2003). A specific probe to detect PtdGlc is essential if we are to fully understand the functional roles of PtdGlc. Because the raft-like microdomain acts as an effective immunogen (Katagiri, 2001, 2002), many monoclonal

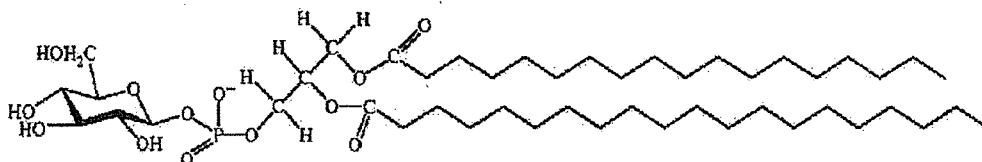
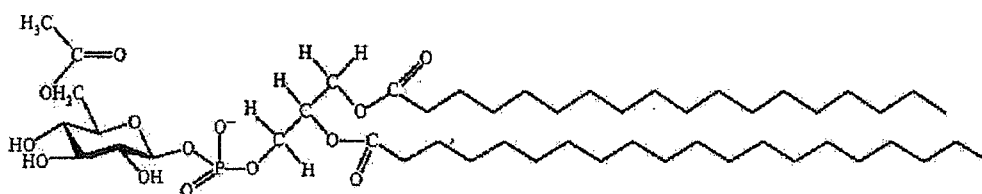
A Phosphatidyl- β -D-glucopyranoside (PtdGlc)B Phosphatidyl- β -D-(6-O-acetyl) glucopyranoside (6-O-Ac-PtdGlc)

FIG. 1. Chemical structure of phosphatidyl- β -D-glucopyranoside (PtdGlc) and phosphatidyl- β -D-(6-O-acetyl) glucopyranoside (6-O-Ac-PtdGlc) isolated from embryonic day 21 fetal rat brain.

antibodies (mAbs) to lipid microdomains have been generated by immunizing mice with raft-like microdomains isolated from differentiated HL60 cells. One of these mAbs, DIM21, preferentially reacts with PtdGlc (Yamazaki *et al.*, 2006). DIM21 immunostaining of mouse brain sections shows that the DIM21-immunoreactive antigen is present in the murine central nervous system and that its expression is regulated during development. DIM21-immunoreactive lipid antigens have also been isolated from fetal rat brains, and analyses of their complete structures reveal that these antigens are PtdGlc and 6-O-Ac-PtdGlc, a form acetylated at position 6 of the PtdGlc glucopyranose ring (Fig. 1) (Nagatsuka *et al.*, 2006). Both glycolipids are composed of a single molecular species of acyl chains—C18:0 at the *sn*-1 position and C20:0 at the *sn*-2 position of the glycerol backbone (Fig. 1). This saturated fatty acyl chain composition strongly suggests that PtdGlc may reside in raft-like lipid microdomains. Here we describe biochemical methods to identify and purify glycolipids from central nervous system tissues.

Isolation of PtdGlc from Developing Brains

Isolating pure PtdGlc from adult rat brains is difficult, because adult rat brain contains very low levels of PtdGlc and because similar acidic glycolipids such as sulfatide are also present. A good source of PtdGlc is fetal rat brain, because sulfatide is not detectable before myelination, which occurs postnatally. At embryonic day 14 (E14), the brain contains lipids that react

with DIM21. The total isolatable amount of PtdGlc in E14 rat brain, however, is quite low, because the dry brain tissue weight of even 100 E14 brains is only 500 mg. Therefore, a more preferable source of PtdGlc is the fetal brain at E21, the stage just before birth. The dry weight of 100 E21 brains is approximately 2.1–2.4 g, from which we can isolate approximately 200–500 nmole/g of PtdGlc. During the isolation procedure, it is important to monitor PtdGlc with orcinol reagent, which detects GSLs, and with mAb DIM21. PtdGlc stains positively with orcinol reagent and mAb DIM21.

Materials for Immunochemical Detection

- POLYGRAM SIL G plate (No. 805 013 [20 × 20 cm] or No. 805 012 [5 × 20 cm]; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany)
- Can Get Signal Immunoreaction Enhancer solution (NKB-101; Toyobo Co., Ltd., Japan)
- HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins (No. 55556; ICN-Cappel, USA)
- Immuno O 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Kit (No. 980571; MP Biomedicals, Inc., USA) or 4-chloro-1-naphthol (No. 08527-64; Nacalai Tesque, Inc., Japan)

Preparation of DIM21 Monoclonal Antibody

The DIM fraction isolated from rGL-7-stimulated HL60 cells is used as an antigen for preparing mAb DIM21, as described previously (Yamazaki *et al.*, 2006). DIM21-producing cells are cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 µg/ml of streptomycin, and 100 U/ml of penicillin at 37° in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The cells (2 × 10⁶/ml) are then transferred to dishes containing SFM-101 serum-free medium (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd, Japan) and cultured for 2 weeks. After harvesting the culture supernatant, IgM is precipitated by treating the supernatant with ammonium sulfate (50% saturation) for 1–2 weeks at 4°. The IgM is then dissolved in Tris-buffered saline (TBS), dialyzed against the same buffer, then purified by using an Immunoassist MGPP gel column (Kanto Chemical Co., Inc., Japan), according to the supplier's recommendations.

TLC Immunostaining

Glycolipid samples are applied to a Polygram Sil G plastic TLC plate, which is developed with a solvent system containing chloroform (C), methanol (M), and water (W) (C:M:W; 65:35:8, v/v/v). To reduce nonspecific staining, the plate is then soaked in a solution of 1% ovalbumin in TBS. Next, the

plate is soaked in 20 $\mu\text{g/ml}$ of DIM21 prepared in Can Get Signal solution 1 and incubated overnight at 4°. After washing with TBS (2×5 min and 1×15 min) with gentle shaking, the plate is reacted with HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins (1:1000; ICN-Cappel) prepared in Can Get Signal solution 2 for 3 hrs at room temperature. After washing with TBS, the antigen is visualized by adding chromogen. Although 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; ICN Biochemicals, Inc., USA) enhanced with of Co^{2+} (0.15 $\mu\text{mole/ml}$) has proven to be a very sensitive means of visualizing PtdGlc, this chromogen cross-reacts with PI. Thus, for the specific visualization of PtdGlc, we recommend using 4-chloro-1-naphtol as a chromogen, although its sensitivity for PtdGlc is weaker than that of DAB.

Extraction of Lipids

We typically use brains from E21 rats for PtdGlc isolation. Ten pregnant female Wistar rats (SLC, Shizuoka, Japan) are deeply anesthetized, fetuses are removed, and fetal rat brains are extirpated immediately. The brains are put into liquid nitrogen and then lyophilized. Total lipids are extracted from 1 g of lyophilized brain tissue with 50 ml of C:M (2:1, v/v) twice, then with C:M:W (5:8:3, v/v/v) twice in a Polytron homogenizer (Polytron Aggregate, Switzerland). After evaporation, the lipid extract is suspended in 300 μl of TBS containing 0.5% Triton X-100 and treated with 250 mU of PI-specific phospholipase C (PIPLC; Sigma) (Ikezawa *et al.*, 1976) at 37° for 1 h. Additional PIPLC (250 mU) is added to the reaction mixture, which is incubated overnight to remove PI. The PIPLC-treated sample is then desalted by Folch's partition (C:M:W; 8:4:3, v/v/v). PtdGlc partitions into the organic layer.

Purification of PtdGlc

PtdGlc is a class of glycerophospholipids that degrades under alkaline conditions. Thus, treating the lipid extract with either sodium hydroxide or potassium hydroxide should be avoided. Passing the extract through a phenylboronate affinity column is essential for removing abundant membrane lipids, such as cholesterol, phosphatidylcholine (PC), and phosphatidylethanolamine (PE). PtdGlc is unique in that it is not completely soluble in organic solvents. For example, PtdGlc does not readily dissolve in chloroform-methanol solvents. If insoluble materials are present during the isolation procedure, adding a few drops of water often improves solubility.

Materials for Purification

- Phenylboronate agarose (PBA 60, Amicon; Millipore, USA)
- Q-Sepharose Fast Flow (No. 17-0510-01; Amersham Biosciences, UK)

- Senshu-pack Aquasil column (4.6 ϕ \times 250 mm; Senshu Scientific Co., Ltd., Japan)

Phenyboronate Agarose Chromatography

After Folch's partition, the organic layer is thoroughly dried, and the dried material is suspended in C:M (8:2, v/v) and loaded onto a PBA column (1 \times 6 cm) to remove non-glycosylated lipids. Before use, the PBA is washed with methanol and pre-equilibrated with C:M (8:2, v/v). Chloroform-methanol-insoluble lipids are also transferred to the column. Unbound lipids (PB-1) are washed from the column by adding 5 column volumes of C:M (8:2, v/v), then the PBA-bound fraction (PB-2) is eluted with 5 column volumes of C:M:W (5:5:1, v/v/v). PtdGlc is eluted in the PB-2 fraction. The PB-2 fraction is dried under a continuous stream of N₂ gas.

Q-Sepharose Chromatography—Method I (Open column)

The dried PB-2 fraction is dissolved in 1–2 ml of C:M (2:1, v/v) then loaded onto an open Q-Sepharose column (1 cm \times 10 cm), previously activated with 1 M sodium acetate in M:W (1:1, v/v), washed with 5 column volumes of methanol, and pre-equilibrated with 5 column volumes of C:M:W (30:60:8, v/v/v). Unbound lipids are removed by washing with C:M:W (30:60:8, v/v/v). PtdGlc is eluted with 50 ml of C:M:aqueous 0.1 M sodium acetate (30:60:8, v/v/v). The lipids remaining in the column are then washed out with C:M:aqueous 2 M sodium acetate (30:60:8, v/v/v). PtdGlc and PI are co-eluted with C:M:aqueous 0.1 M sodium acetate.

Q-Sepharose Chromatography—Method II (HPLC)

The dried PB-2 fraction is dissolved in 1 ml of C:M (2:1, v/v) then loaded onto a packed Q-Sepharose column (7.6 ϕ \times 250 mm), previously equilibrated with C:M:W (30:60:8, v/v/v). After washing the column with C:M (2:1, v/v) for 10 min, the lipids retained within the column are eluted for 90 min with a gradient of solvents, starting with C:M:W (30:60:8, v/v/v) and ending with C:M:aqueous 0.25 M sodium acetate (30:60:8, v/v/v). An HPLC system is used set at a flow rate of 1 ml/min.

For both methods, the elution profile of the lipids is monitored by TLC and TLC-immunostaining with DIM21. The lipids (mainly gangliosides) remaining in the column are then washed out with C:M:aqueous 2 M sodium acetate (30:60:8, v/v/v). The packed column must be washed with M:W (1:1, v/v) for more than 1 h before re-use.

Aquasil Chromatography Using HPLC

PtdGlc-containing fractions are pooled, partitioned with the Folch's solvent system, then the organic solvent layer is dried with a N₂ gas evaporator.

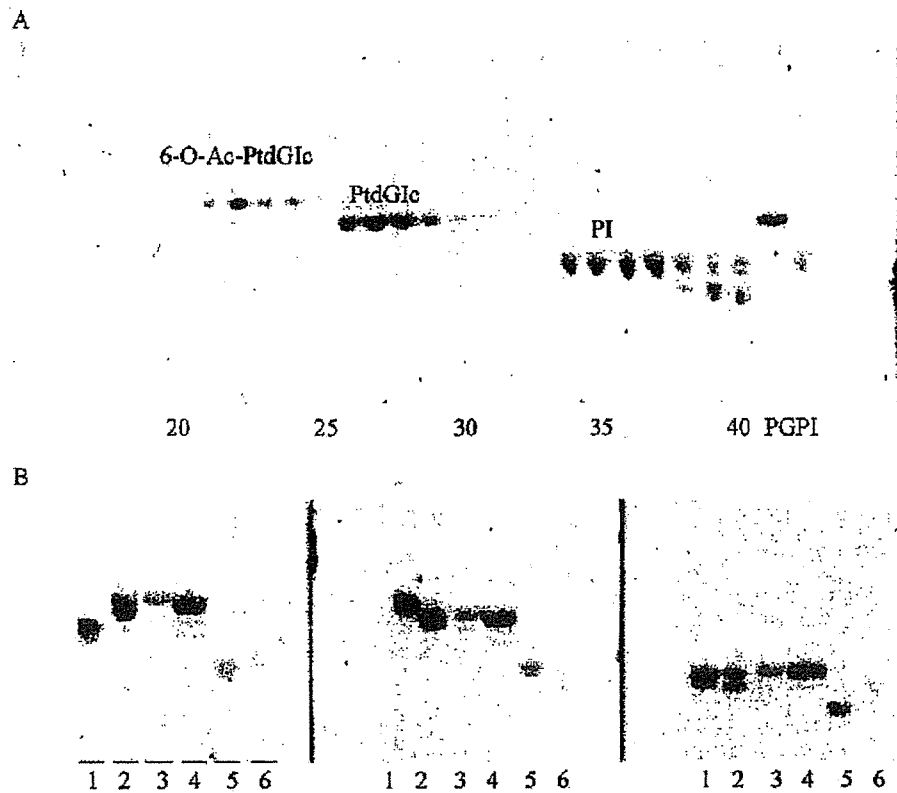


FIG. 2. TLC analysis. (A) The glycolipids eluted using Aquasil column chromatography. The solvent system of I in (B) was used. (B) Lane 1, LacCer; lane 2, sulfatide; lane 3, 6-O-Ac-PtdGlc; lane 4, PtdGlc; lane 5, PI; and lane 6, PC. TLC was developed using the solvent system of I (C:M:2.5N NH₄OH; 60:35:8, v/v/v), II (C:M:W; 60/35/8, v/v/v), and III (C:Acetone:M:HOAc:W; 5:2:1:1:0.5, v/v/v/v). The lipids were visualized with orcinol reagent. Abbreviations: LacCer, lactosylceramide; 6-O-Ac-PtdGlc, phosphatidyl- β -D-(6-O-acetyl) glucopyranoside; PtdGlc, phosphatidyl- β -D-glucopyranoside; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine. (See color insert.)

The dried material is then dissolved in 1 ml of C:M (2:1, v/v) and loaded onto a Senshu-pack Aquasil column in an HPLC system. After washing with C:M (9:1, v/v), elution is done with a gradient of solvents, starting with C:M (9:1, v/v) and ending with C:M (7:3, v/v) for 90 min (Fig. 2A).

Identification of PtdGlc by Normal-phase HPLC/Electrospray Ionization Ion-trap Mass Spectrometry

Mass spectrometry (MS) is one of the most powerful and sensitive methods to identify lipid classes and their molecular species on a structural basis. PtdGlc is a structural isomer of PI. The mass-to-charge ratio (m/z)

values of their polar head groups, phosphoglucose and phosphoinositol, are the same, but their chemical natures differ in that glucose in PtdGlc is an aldose and inositol in PI is a cyclic polyalcohol. Normal-phase HPLC can recognize slight differences in the polarity of functional groups. To differentiate between PtdGlc and PI contained within crude lipid extracts, both HPLC separation and tandem mass spectrometry are required. Ion-trap mass spectrometry is suitable for such a task, because it has better connectivity for HPLC, has greater full-scan sensitivity, and has data-dependent MSⁿ capability. Finnigan ion- or linear-trap mass spectrometers fulfill the requirements for discriminating between PtdGlc and PI through automatic gain control, optimal adjustment of collision energy on the basis of *m/z* values of analytes, and software-controlled data-dependent MSⁿ acquisition. Next, we describe how to use a combined normal phase HPLC-electrospray ionization (ESI) LCQdeca-XP mass spectrometer (Thermo Electron Corp., USA) apparatus to analyze the PtdGlc molecular species contained within crude lipid extracts.

One of the authors (H. T.) has developed a method capable of analyzing a wider range of lipid classes from neutral lipids to phospholipids on a single chromatographic run with three solvent gradients and post-column mixing of solvents that aids the ESI of lipids eluted earlier with nonpolar solvents. This method has been used to analyze phospholipids (Ito *et al.*, 2002) and ceramides (Takagi *et al.*, 2003). The method we describe in the following is essentially based on the phospholipid analysis mode (Ito *et al.*, 2002) of the comprehensive method.

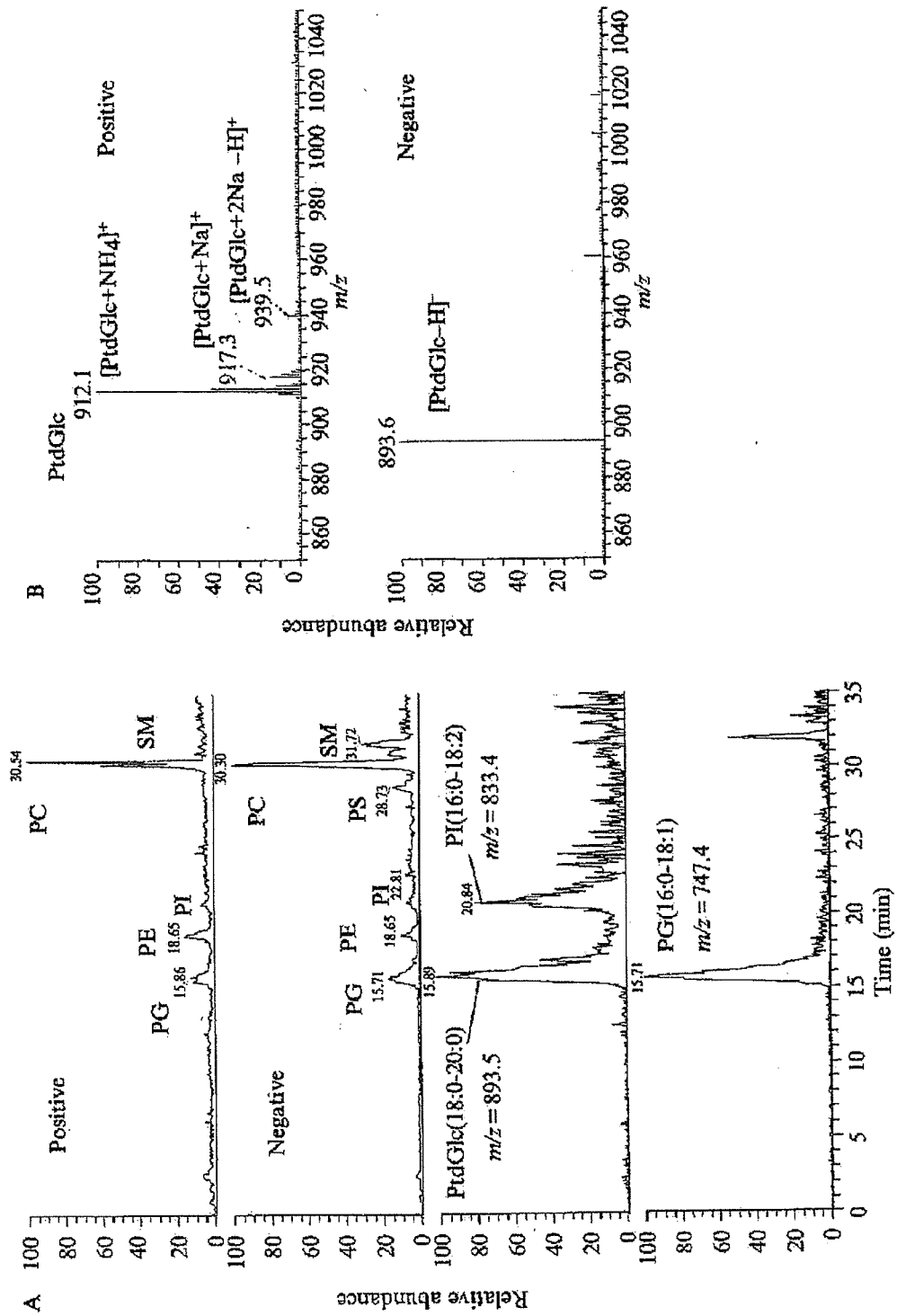
HPLC

In the phospholipid analysis mode, a binary gradient was operated with intelligent pulse-less pumps (OmniSeparo-TJ, Hyogo, Japan) without post-column mixing of ESI-facilitating solvents.

Elution Solvents

- Solvent A: hexane:2-propanol (4:6, v/v)
- Solvent B: hexane:2-propanol:water (4:6:1.2, v/v/v) containing 20 mM ammonium formate

A precolumn and a separation silica column (1 × 20 mm and 1 × 150 mm, respectively; OmniSeparo-TJ, Japan) fitted to a switching valve (Valco Instruments Co., USA) are sequentially connected to each other and pre-equilibrated with solvent A. An aliquot of extracted and partially purified lipids (1–2 μl) is applied onto the trap. When a large amount of less polar contaminants is present in samples, it may be necessary to disconnect the



trap from the separation column, wash with the same eluent (solvent A), and then re-connect the trap by switching the valve. Phospholipids bound to the trap are eluted through the separation column with the following graded solvent sequence: 0–85% solvent B in 25 min; hold at 85% for 5 min; 100% solvent B in 2 min; hold at 100% for 5 min at a flow rate of 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Mass Spectrometer

To increase ionization efficiency, the recently developed fluoropolymer-coated ESI tip, FortisTip (Tojo, 2004) (20 μm ID, 150 μm OD; OmniSeparo-TJ, Japan), is fitted onto an XYZ stage (AMR, Japan), with its exit end placed 2–3 mm in front of a heated capillary inlet. The effluent is dispersed by means of a T splitter, yielding a flow rate of 0.5–1 $\mu\text{l}/\text{min}$ across the tip. The effluent is monitored with a Finnigan LCQdeca-XP spectrometer set to either data-dependent negative or positive tandem MS (MS^2) mode, as well as to alternate positive and negative ion full scan (alternate polarity switching) mode on a single run with the automatic gain control on. An ESI voltage of 1.6 kV is used.

Analysis of PtdGlc

Figure 3 shows base-peak and ion chromatograms of a mixture of synthetic PtdGlc and various standard phospholipids (~ 1 pmol each) in the alternate polarity-switching mode. Stearoyl-arachidoyl-PtdGlc ($m/z = 893$) is well separated from soybean PI, with palmitoyl-linoleoyl being the most abundant species ($m/z = 833$). In general, during analysis of anionic phospholipids, ESI generates abundant $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions but very few $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions; PtdGlc conforms to this rule (Fig. 3B). The presence of ammonium ions in elution solvents greatly promotes the formation of ammonium adduct ions from PtdGlc, although minor $[\text{M} + \text{Na}]^+$ and $[\text{M} + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ions are discernible. PtdGlc co-elutes with phosphatidylglycerol (PG) ($m/z = 747$) in normal-phase HPLC under the conditions used (Fig. 3), but the m/z values and MS^2 spectra of these two anionic phospholipids are easily discriminated.

FIG. 3. Analysis of mixtures containing standard phospholipids and synthetic PtdGlc. Standard phospholipids include palmitoyl-oleoyl-PG (phosphatidylglycerol), palmitoyl-oleoyl-PE, soybean PI, palmitoyl-oleoyl-PS (phosphatidylserine), palmitoyl-oleoyl-PC, and bovine brain sphingomyelin (SM). (A) Base-peak chromatograms in the positive and negative ion modes and ion chromatograms in the negative ion mode at the indicated m/z values. (B) Full-scan MS spectra of PtdGlc in the positive and negative modes. A MS^2 spectrum of $m/z = 960.8$ ions in the negative ion mode contains an intense $m/z = 893$ peak corresponding to PtdGlc.