

often demonstrates negative results for HSV and VZV DNA, and they do not respond well to antiherpetic treatment. These cases are diagnosed as idiopathic corneal endotheliitis and their prognosis is poor because of progressive deterioration of the corneal endothelium.

Members of the authors' group from Kyoto Prefectural University of Medicine recently reported a patient with unilateral corneal endotheliitis without systemic immunodeficiency whose aqueous humor was found by polymerase chain reaction (PCR) assay to contain cytomegalovirus (CMV) DNA.<sup>13</sup> To the best of the authors' knowledge, this was the first report of CMV-induced corneal endotheliitis. Subsequently, other members of our group from Ehime University School of Medicine reported a second case of CMV corneal endotheliitis in a patient who had undergone keratoplasty.<sup>14</sup> Recently, other investigators have described CMV corneal endotheliitis diagnosed by nested multiplex PCR in human immunodeficiency virus-negative patients.<sup>15</sup> Cytomegalovirus is an opportunistic pathogen that induces various pathologic characteristics in immunosuppressed individuals. Although many late-phase AIDS patients experience CMV retinitis, with one article reporting a case of corneal stromal keratitis in CMV retinitis patients,<sup>16</sup> there have been few reports of primary CMV corneal infection that are not accompanied by CMV retinitis in either immunocompromised or immunocompetent hosts. The authors consider CMV to be an important etiologic factor of corneal endotheliitis and herein present clinical findings and responses to antiviral therapy of 8 patients diagnosed with CMV corneal endotheliitis based on the PCR detection of CMV DNA from aqueous humor.

## Patients and Methods

The study population consisted of 8 consecutive patients whose active corneal endotheliitis was diagnosed and treated between November 2004 and May 2006 at the Departments of Ophthalmology of Kyoto Prefectural University of Medicine (patients 1–5) and Ehime University School of Medicine (patients 6–8). Of these 8 patients, patients 1 and 6 were previously reported as individual case reports by these 2 departments independently<sup>13,14</sup>; they are also included here with more detailed information of long-term observation. The study protocol was approved by the university ethical committees and informed consent was obtained from all patients. The cohort comprised 6 men and 2 women ranging in age from 51 to 83 years (mean, 68.5 years). Using a 30-gauge needle, 100  $\mu$ l aqueous humor were aspirated from the affected eye and subjected to PCR assay.

In Kyoto Prefectural University of Medicine, DNA extraction and PCR condition were based on the previously reported method established by the authors' group for the diagnosis of herpes virus ocular diseases.<sup>17–19</sup> Aqueous humor samples were incubated at 55°C for 5 hours in a final reaction volume of 500  $\mu$ l containing 0.5% sodium dodecyl sulfate, 100  $\mu$ g/ml proteinase K, 1 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid, and 10 mmol/l TRIS hydrochloride (pH, 7.8). After glycogen was added as a carrier, the DNA was precipitated with ethanol and dissolved in 10  $\mu$ l distilled water. The PCR reaction for each sample included 1  $\mu$ l DNA and 24  $\mu$ l PCR reaction buffer (10 mmol/l TRIS hydrochloride, 1.5 mmol/l magnesium chloride, 0.01% gelatin) in the presence of 80  $\mu$ M each of all 4 triphosphates, 5 pmol each of oligonucleotide primers, and 1.25 U Taq DNA polymerase. The primers used for CMV allowed

amplification of a 400-base pair sequence of CMV DNA that codes for a portion of a late antigen of CMV<sup>20</sup> (5'-CACCTGTAC-CGCTGCTATATTTTC, 3'-CACCACGCAGCGCCCTTGAT-GTTT). For HSV amplification, primer pairs previously shown to identify a specific 142-base pair segment of the DNA polymerase gene of the HSV genome<sup>21</sup> (5'-ATCCGAACGAGCCCGCTG, 3'-TCTCCGTCAGTCGTTTATCTTC) were used. The primer pairs for VZV were used to amplify a 642-base pair target sequence that is incorporated in the EcoRI-D fragment of the VZV genome<sup>22,23</sup> (5'-TTCAGCCAACGTGCCAATAAAA, 3'-GACGCGTTAACG-GAAGTAAC). Thirty-two independent repeated cycles of the PCR reaction were carried out at 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. The authors confirmed that the method was sufficiently sensitive to detect HSV DNA in eyes with clinically diagnosed herpetic keratitis and uveitis and was reliable enough not to give false-positive results in normal subjects (reduced sensitivity PCR).<sup>17–19</sup>

In Ehime University, DNA extraction and viral PCR were performed by a Japanese company specializing in laboratory testing services (SRL, Inc., Tokyo, Japan).<sup>14</sup> DNA was extracted from specimens using QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). An 186-base pair segment of the major immediate-early gene of the CMV genome was amplified by PCR using primer pairs (5'-TTA GTG AAC CGT CAG ATC GC, 3'-GCA TGC ATA AGA AGC CAA GG). Herpes simplex virus DNA and VZV DNA were detected by PCR using primer pairs that identify a specific 234-base pair segment of the DNA polymerase gene of the HSV genome (5'-AGATGGCGACCCACATCTC, 3'-CTC-CGGATACGGTATCGTC) and a specific 216-base pair segment of the *ORF38* gene of the VZV genome (5'-TCACGAACCGTT-GACAGGAC, 3'-CCACTACTCAITGTATCCCGC). The PCR cycling conditions were: 40 cycles of denaturation for 1 minute at 94°C, elongation for 2 minutes at 72°C, and annealing for 1 minute at 57°C for VZV or 58°C for CMV and HSV.<sup>14</sup>

## Results

The aqueous humor collected from the affected eyes of patients 1 through 5 contained CMV, but not HSV or VZV DNA. For these 5 eyes, the specificity of the amplified band was confirmed by Southern blot analysis.<sup>17</sup> Under the same PCR conditions, none of 5 aqueous samples from cataract patients nor 7 aqueous samples from patients with uveitis demonstrated positive results for CMV, HSV, or VZV DNA. Likewise, the aqueous humor from the affected eyes of patients 6 through 8 contained CMV, but neither HSV nor VZV DNA were detected in aqueous humor samples of a patient without intraocular inflammation nor in 3 nonviral uveitis patients.

The clinical profiles of all 8 patients from the 2 centers is summarized in Table 1 (available at <http://aaojournal.org>). Of the 8 patients, 4 had never undergone corneal surgery, and of these 4 patients, 3 patients (patients 1, 7, and 8) had a history of chronic uveitis of unknown origin. The other 4 patients (patients 2, 4, 5, and 6) had previously received penetrating keratoplasty for endothelial dysfunction resulting from recurrent corneal endotheliitis (patient 4), for Fuchs' dystrophy (patient 2), or for corneal opacity (patients 5 and 6). None of the patients manifested systemic immune deficiency or CMV antigenemia. Serologic analysis of immunoglobulin M and immunoglobulin G showed that all 8 patients had previously been infected with CMV. The average follow-up period after CMV detection was 10.4 months (range, 2–24 months). Because patients 3, 4, 6, and 7 were followed up under an initial diagnosis of idiopathic corneal endotheliitis before the detection of CMV DNA, the average duration of corneal endotheliitis was 46.6 months (range, 2 months–20 years).



The clinical findings of CMV corneal endotheliitis are summarized in Table 2 (available at <http://aaojournal.org>). Typical findings, including linear keratic precipitates associated with multiple coin-shaped lesions and localized corneal stromal edema, were observed in 4 eyes (Fig 1A). According to the previously reported classification of HSV corneal endotheliitis,<sup>11</sup> corneal manifestations of these 8 cases were classified as linear corneal endotheliitis, but not disciform or diffuse corneal endotheliitis. Linear keratic precipitates were found at the leading edge of the corneal endotheliitis and advanced slowly centrally before ganciclovir treatment. After ganciclovir therapy, the corneal edema subsided quickly and the leading edge moved back to the peripheral cornea. In all 8 patients, coin-shaped (nummular) lesions were detected on the corneal endothelial surface. These consisted of medium-sized keratic precipitates arranged in a circumferential pattern. Coin-shaped lesions typically were detected on the central side (clear area) of the leading edge of the corneal edema (Fig 1A, C). In the area inside the coin-shaped lesions, corneal edema was prominent in cases without topical steroid administration (Fig 1C), whereas with topical steroid therapy, less corneal edema was detected and coin-shaped lesions were seen more clearly by retroillumination (Fig 1E). In the 4 patients who had undergone keratoplasty, keratic precipitates were seen on both donor and host corneas, thus distinguishing the corneal endotheliitis from endothelial rejection. Invariably, the corneal endotheliitis started in the peripheral area of the graft, including the surrounding host cornea. With the exception of patient 7, the anterior chamber reaction was minimal. None of the 8 patients had CMV retinitis at presentation. In 6 eyes, intraocular pressure (IOP) was elevated; these patients received a topical or systemic medication for IOP control.

Medications for corneal endotheliitis and final outcome are shown in Table 3 (available at <http://aaojournal.org>). Systemic antiviral therapy consisting of ganciclovir was delivered immediately after diagnosis in 6 patients (all except patients 2 and 3). Patient 2 started ganciclovir treatment 8 months after CMV detection, and patient 3 declined ganciclovir treatment and was treated with valacyclovir. Of the 8 patients, 6 patients (patients 1, 4, 5, 6, 7, and 8) responded quickly to systemic antiviral therapy. At midterm follow-up, 6 eyes retained a clear cornea; however, patients 2 and 3 experienced bullous keratopathy resulting from irreversible corneal endothelial dysfunction (Fig 1B).

## Case Reports

### Patient 4

A 51-year-old man began to experience recurrent episodes of bilateral corneal endotheliitis of unknown origin in the 1980s (Fig 1C). Aqueous humor samples subjected to PCR at the time of his previous attack returned negative results for HSV and VZV; CMV was not examined at that time. Despite HSV-targeting combination treatment consisting of oral acyclovir and topical acyclovir and corticosteroid, his corneal endotheliitis recurred often and he experienced bullous keratopathy. He had undergone penetrating keratoplasty in his right eye in 1984 and in both eyes in 1986; however, recurrent corneal endotheliitis with multiple coin-shaped lesions in both eyes (Fig 1D) culminated in graft failure. His visual acuity was hand movements in both eyes. Polymerase chain reaction analysis of aqueous humor samples collected during a second keratoplasty for his left eye in July 2005 at Kyoto Prefectural University of Medicine detected CMV DNA. Its specificity was confirmed by Southern blot analysis (Fig 2).

After surgery, his best-corrected visual acuity in the left eye improved to 20/50; however, 6 weeks later, he again experienced left corneal endotheliitis with multiple coin-shaped lesions on the

endothelial surface of both donor and host sides. No cellular infiltration was detected in the corneal stroma. Based on the diagnosis of CMV corneal endotheliitis, 10 mg/kg ganciclovir daily for 10 days was administered intravenously. He responded quickly and has remained free of further episode. The graft placed in July 2005 was clear at 1 year of follow-up, and no CMV DNA was detected in aqueous humor from the left eye.

### Patient 7

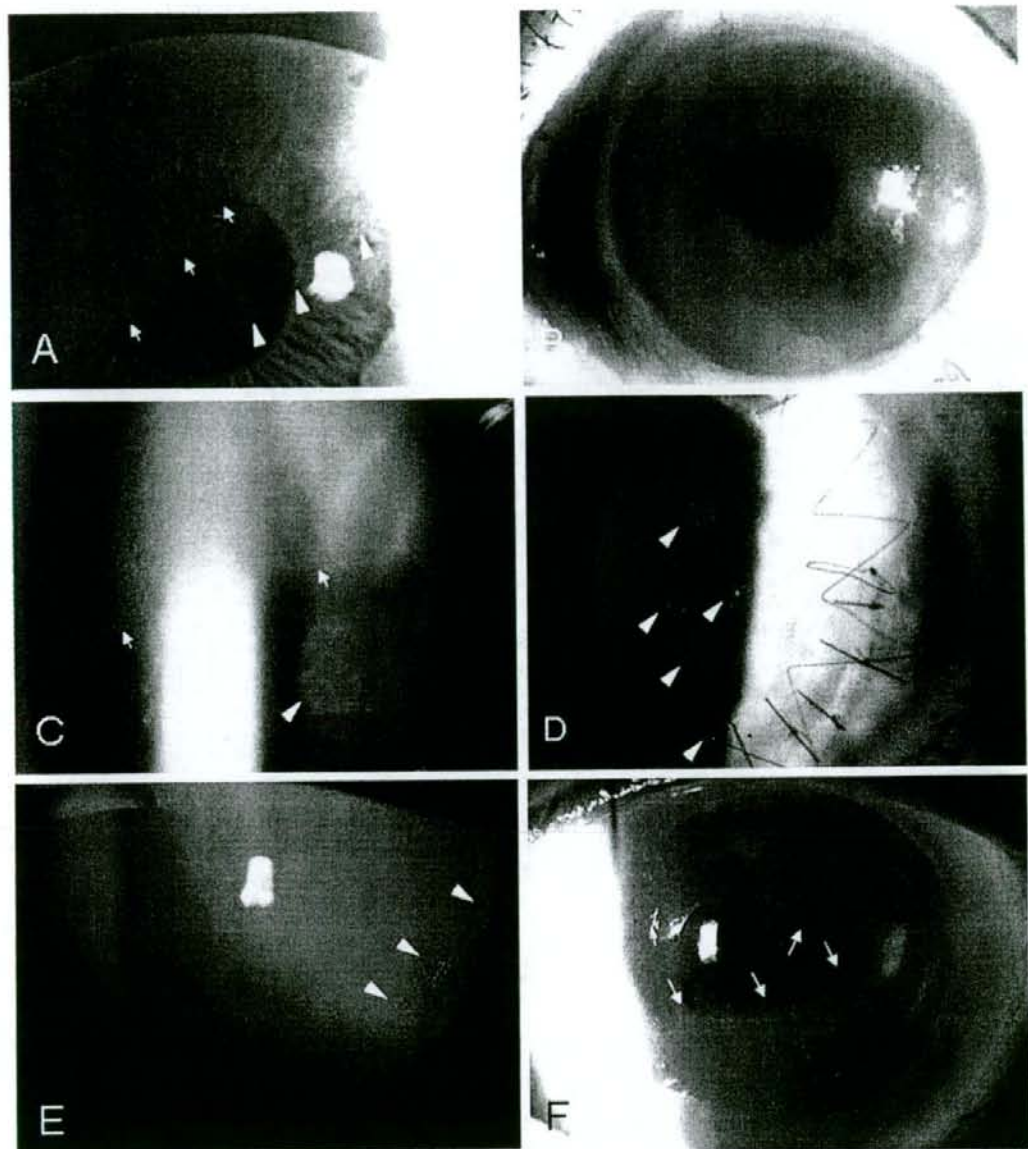
A 60-year-old man had been receiving treatment with corticosteroid eye drops since November 2000 for corneal subepithelial infiltrates of unknown origin in the right eye. Slit-lamp examination at Ehime University School of Medicine in May 2004 revealed white keratic precipitates lining a coin-shaped lesion in the lower nasal part of the cornea, and in October 2004, corneal edema and coin-shaped lesions were noted that were strongly suspicious of corneal endotheliitis (Fig 1E). Although topical acyclovir and oral valacyclovir were added to his corticosteroid eye drops, the area of stromal edema spread progressively and he experienced inflammation of the anterior chamber and anterior vitreous. In September 2005, he underwent pars plana vitrectomy to remove vitreous opacities. Vitreous samples collected during the operation demonstrated negative results for HSV and VZV DNA. Assay for CMV was not carried out at that time.

After surgery, the vitreous inflammation subsided; however, the corneal stromal edema progressed centrally (Fig 1F) and his IOP increased. Aqueous humor samples were subjected to PCR, and CMV DNA was detected. Under a diagnosis of corneal endotheliitis of CMV origin, systemic (10 mg/kg daily for 7 days) and topical (0.5% eye drops 8 times daily) ganciclovir were administered. In a rapid response to this treatment, the stromal edema disappeared and his IOP decreased. He was instructed to continue the topical application of ganciclovir, and there has been no recurrence for 8 months.

## Discussion

The mechanisms regulating the latency and reactivation of CMV in the course of natural infection remain poorly understood. Cytomegalovirus DNA has been detected in human peripheral blood monocytes<sup>24,25</sup> and CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors.<sup>26</sup> The clinical observations that corneal endothelial lesions always start from the periphery and move toward the center of the cornea imply that tissues surrounding the cornea such as the trabecular meshwork or ciliary body may be the reservoir for CMV. The finding that bone marrow-derived cells migrate to the cornea<sup>27</sup> supports this hypothesis, as does the observation that murine CMV inoculated intraperitoneally reaches the cornea of nude mice via the bloodstream.<sup>28</sup>

Although the pathogenesis of CMV corneal endotheliitis is not yet understood, one must consider that anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) occurs in the anterior chamber, a unique immune-privileged site.<sup>29-32</sup> Zheng et al,<sup>33</sup> who suggested that ACAID may play an important role in the pathogenesis of herpetic corneal endotheliitis, established an animal model by inducing ACAID in rabbits first inoculated with inactivated HSV and then infected intracamerally with live HSV. In these animals, endothelial lesions developed whose clinical appearance greatly resembled human corneal endotheliitis. Their findings raise the



**Figure 1.** Clinical manifestations of cytomegalovirus corneal endotheliitis examined by slit-lamp biomicroscopy. **A**, Photograph from patient 1 showing localized corneal stromal edema in the upper half of the cornea. Note the linear keratic precipitates (arrows) and coin-shaped lesions (arrowheads). **B**, Photograph from patient 3 showing that the corneal endotheliitis failed to respond to more than 1 year of treatment with acyclovir. Because analysis demonstrated that the aqueous humor had negative results for herpes simplex virus (HSV) and varicella zoster virus (VZV) DNA at disease onset, a diagnosis of idiopathic corneal endotheliitis was made. One year after onset, polymerase chain reaction analysis identified cytomegalovirus (CMV) DNA in the aqueous humor. Corneal edema spread over the entire cornea, and eventually, bullous keratopathy developed in the patient. **C**, Photograph obtained at disease onset from patient 4 showing severe corneal edema in the upper half of the cornea. Note the linear keratic precipitates (arrows) and coin-shaped lesions (arrowhead). The patient had negative results for HSV and VZV DNA, and a diagnosis of idiopathic corneal endotheliitis was made. Eventually, bullous keratopathy developed in the eye. **D**, Photograph from patient 4 obtained 3 months after keratoplasty corneal endotheliitis recurred, accompanied by the typical coin-shaped lesions (arrowheads). **E**, Photograph from patient 7 obtained at disease onset. In October 2004, corneal endotheliitis was diagnosed based on the presence of coin-shaped lesions (arrowheads) accompanied by slight corneal stromal edema. The response to acyclovir and valacyclovir was insufficient, and the corneal endotheliitis worsened. **F**, Photograph from patient 7 obtained 11 months after disease onset. In September 2005, the corneal stromal edema became severe and involved approximately 75% of the cornea (arrows). Polymerase chain reaction analysis detected CMV DNA in the aqueous humor.



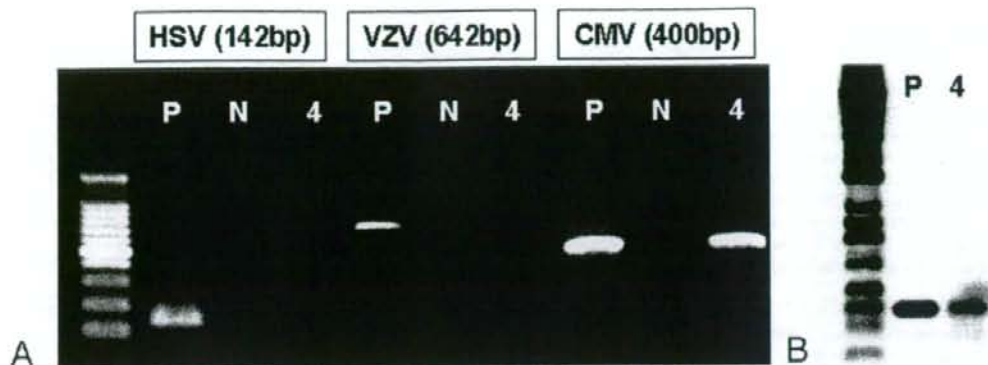


Figure 2. A, Representative polymerase chain reaction assays for DNA from herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus (VZV), and cytomegalovirus (CMV) that were performed at Kyoto Prefectural University of Medicine. B, Southern blot analysis results confirming the specificity of the amplified CMV DNA. 4 = aqueous humor sample from patient 4; N = negative control; P = positive control.

possibility that ACAID is the underlying pathogenic mechanism of herpetic corneal endotheliitis. If CMV is reactivated in the anterior chamber (including the corneal endothelium) and ACAID prevents the control of its proliferation by cell-mediated immunity, viral infection may develop in the corneal endothelium. The authors postulate that this was the scenario in their patients.

Cytomegalovirus corneal endotheliitis may represent a newly identified clinical entity of reactivated CMV in the anterior chamber of healthy subjects free of accompanying systemic symptoms. In patients with this disease, it is crucial to consider the possibility not only of HSV and VZV, but also of CMV infection, especially if there is a poor response to topical and systemic acyclovir or coin-shaped lesions develop. These patients should be switched to systemic ganciclovir to prevent further loss of corneal endothelial cells. It is noteworthy that the 2 patients in the current series (patients 2 and 3) who did not have ganciclovir treatment soon after CMV detection failed to maintain a clear cornea.

Coin-shaped lesions are observed commonly in patients with CMV-induced corneal endotheliitis, and clinical manifestations similar to the coin-shaped lesions have been described variously as keratic precipitates in a circular pattern or a ring configuration.<sup>15</sup> The authors suggest that these features are a characteristic sign of this condition and may represent the viral plaques generally seen in virus titration procedures. In fact, in patient 8, inspection under a confocal microscope disclosed a group of enlarged endothelial cells with owl's eye appearance<sup>34</sup> around the lesion.<sup>35</sup>

Although it is reasonable to assume that CMV retinitis does not occur in patients with corneal endotheliitis because their immune system protects against the development of retinal pathologic features, the association of pars planitis and presumed immune corneal endotheliopathy has been reported in 4 patients with clinical manifestations resembling corneal endotheliitis.<sup>36</sup> Patient 7 in the current series, who had vitreous opacity as well as localized corneal edema associated with keratic precipitates at presentation, may fall

into this category. This suggests that some patients with pars planitis of unknown origin may also have CMV infection.

During the course of this investigation, the authors encountered 2 immunodeficient patients with CMV corneal endotheliitis (unpublished data). They were not included in this study because the authors were unable to examine their aqueous humor for the presence of CMV DNA. However, the finding that both were positive for CMV antigenemia strongly suggests that CMV infection may have been an etiologic factor in their corneal endotheliitis, and the authors conclude that the increased incidence of human immunodeficiency virus infection and of organ and bone marrow transplantation may lead to a concomitant increase in CMV corneal endotheliitis in immunocompromised individuals.

## References

1. Khodadoust AA, Attarzadeh A. Presumed autoimmune corneal endotheliopathy. *Am J Ophthalmol* 1982;93:718-22.
2. Ohashi Y, Kinoshita S, Mano T, et al. Idiopathic corneal endotheliopathy: a report of two cases. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1666-8.
3. Vannas A, Ahonen R. Herpetic endothelial keratitis: a case report. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1981;59:296-301.
4. Sutcliffe E, Baum J. Acute idiopathic corneal endotheliitis. *Ophthalmology* 1984;91:1161-5.
5. Maudgal PC, Missotten L, De Clercq E, Descamps J. Varicella-zoster virus in the human corneal endothelium: a case report. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1980;190:71-86.
6. Ohashi Y, Yamamoto S, Nishida K, et al. Demonstration of herpes simplex virus DNA in idiopathic corneal endotheliopathy. *Am J Ophthalmol* 1991;112:419-23.
7. Robin JB, Steigner JB, Kaufman HE. Progressive herpetic corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol* 1985;100:336-7.
8. Mimura T, Amano S, Nagahara M, et al. Corneal endotheliitis and idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Am J Ophthalmol* 2002;133:699-700.
9. Amano S, Oshika T, Kaji Y, et al. Herpes simplex virus in the trabeculum of an eye with corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol* 1999;127:721-2.

- Cheng CK, Chang SW, Hu FR. Acyclovir treatment for linear endotheliitis on grafted corneas. *Cornea* 1995;14:311-5.
- Holland EJ, Schwartz GS. Classification of herpes simplex virus keratitis. *Cornea* 1999;18:144-54.
- Liesegang TJ. Classification of herpes simplex virus keratitis and anterior uveitis. *Cornea* 1999;18:127-43.
- Koizumi N, Yamasaki K, Kawasaki S, et al. Cytomegalovirus in aqueous humor from an eye with corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol* 2006;141:564-5.
- Suzuki T, Hara Y, Uno T, Ohashi Y. DNA of cytomegalovirus detected by PCR in aqueous of patient with corneal endotheliitis following penetrating keratoplasty. *Cornea* 2007;26:370-2.
- Chee SP, Baesal K, Jap A, et al. Corneal endotheliitis associated with evidence of cytomegalovirus infection. *Ophthalmology* 2007;114:798-803.
- Inoue T, Hayashi K, Omoto T, et al. Corneal infiltration and CMV retinitis in a patient with AIDS. *Cornea* 1998;17:441-2.
- Yamamoto S, Pavan-Langston D, Kinoshita S, et al. Detecting herpesvirus DNA in uveitis using the polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1996;80:465-8.
- Yamamoto S, Shimomura Y, Kinoshita S, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in human tear film by the polymerase chain reaction. *Am J Ophthalmol* 1994;117:160-3.
- Koizumi N, Nishida K, Adachi W, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in atypical epithelial keratitis using polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1999;83:957-60.
- Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988;158:1177-84.
- Powell KF, Anderson NE, Frith RW, Croxson MC. Non-invasive diagnosis of herpes simplex encephalitis [letter]. *Lancet* 1990;335:357-8.
- Usui M, Usui N, Goto H, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic intraocular inflammation. *Ocul Immunol Inflamm* 1993;1:105-12.
- Nishi M, Hanashiro R, Mori S, et al. Polymerase chain reaction for the detection of the varicella-zoster genome in ocular samples from patients with acute retinal necrosis. *Am J Ophthalmol* 1992;114:603-9.
- Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991;72:2059-64.
- Larsson S, Soderberg-Naucler C, Wang FZ, Moller E. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* 1998;38:271-8.
- Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* 1996;77:3099-102.
- Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:497-503.
- Hayashi K, Suwa Y, Shimomura Y, Ohashi Y. Pathogenesis of ocular cytomegalovirus infection in the immunocompromised host. *J Med Virol* 1995;47:364-9.
- Streilein JW, Wilbanks GA, Taylor A, Cousins S. Eye-derived cytokines and the immunosuppressive intraocular microenvironment: a review. *Curr Eye Res* 1992;11(suppl):41-7.
- Streilein JW. Ocular immune privilege and the Faustian dilemma. The Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1940-50.
- Streilein JW. Molecular basis of ACAID. *Ocul Immunol Inflamm* 1997;5:217-8.
- Niederhorn JY, Streilein JW. Analysis of antibody production induced by allogeneic tumor cells inoculated into the anterior chamber of the eye. *Transplantation* 1982;33:573-7.
- Zheng X, Yamaguchi M, Goto T, et al. Experimental corneal endotheliitis in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:377-85.
- Herriot R, Gray ES. Images in clinical medicine: owl's-eye cells. *N Engl J Med* 1994;331:649.
- Shiraishi A, Hara Y, Takahashi M, et al. Demonstration of "owl's eye" pattern by confocal microscopy in a patient with presumed cytomegalovirus corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol* 2007;143:715-7.
- Khodadoust AA, Karnama Y, Stoessel KM, Puklin JE. Pars planitis and autoimmune endotheliopathy. *Am J Ophthalmol* 1986;102:633-9.

Table 1. Patient

Patient No.	Age/Gender	Affected Eye	Type of Endotheliitis	History of Ocular Disease	Medications before CMV Detection			
					Antiviral Drug	Steroid	Antibiotics	Antiglaucoma Drug
1	51/M	Left	U	Anterior uveitis, <sup>†</sup> secondary glaucoma	—	0.1% betamethasone	—	2% carteolol, 0.005% latanoprost
2	73/F	Right	U	Keratoplasty for Fuchs dystrophy	—	0.1% dexamethasone	0.5% levofloxacin	—
3	83/F	Right	U	Idiopathic corneal endotheliitis, <sup>†</sup> ocular hypertension	0.3% acyclovir, valacyclovir	0.1% betamethasone	—	0.5% timolol
4	51/M	Left	B	Keratoplasty for BK due to idiopathic corneal endotheliitis, <sup>†</sup> ocular hypertension	0.3% acyclovir	0.1% dexamethasone	0.5% levofloxacin	2% carteolol
5	78/M	Right	U	Keratoplasty for corneal opacity, ocular hypertension	—	0.1% dexamethasone	0.3% ofloxacin	2% carteolol
6	77/M	Left	U	Keratoplasty for corneal opacity	0.3% acyclovir, valacyclovir	0.1% betamethasone	0.5% levofloxacin	—
7	60/M	Right	U	Uveitis, <sup>†</sup> idiopathic corneal endotheliitis, <sup>†</sup> secondary glaucoma	0.3% acyclovir, valacyclovir	0.1% betamethasone	—	Systemic acetazolamide
8	75/M	Right	U	Anterior uveitis, <sup>†</sup> secondary glaucoma	0.3% acyclovir, valacyclovir	0.1% betamethasone	—	1% brinzolamide, systemic acetazolamide

B = bilateral; BK = bullous keratopathy; CMV = cytomegalovirus; F = female; M = male; U = unilateral.

<sup>†</sup>Includes the period before CMV was examined.

<sup>‡</sup>Herpes simplex virus and varicella zoster virus were not detected by polymerase chain reaction in aqueous humor and clinically resistant to acyclovir

Table 2. Clinical Findings of Cytomegalovirus (CMV) Corneal Endotheliitis

Patient No.	Affected Eye	Slit-Lamp Findings				Funduscopy Findings		IOP (mmHg)
		Com-Shaped Lesions	Linear KPs	Stromal Edema	AC Inflammation	CMV Retinitis		
1	Left	+	+	2+	1+	—	18*	
2	Right	+	+	2+	1+	—	17	
3	Right	+	+	3+	—	—	12*	
4	Left	+	—	1+	1+	—	15*	
5	Right	+	—	2+	—	—	9*	
6	Left	+	—	2+	—	—	9	
7	Right	+	—	3+	3+	—	30 <sup>†</sup>	
8	Right	+	+	2+	—	—	32 <sup>‡</sup>	

AC = anterior chamber; IOP = intraocular pressure; KPs = keratic precipitates.

Stromal edema and AC inflammation were evaluated from 0 to 3+ based on the slit-lamp examination.

\*Controlled by topical medication.

<sup>†</sup>Controlled by systemic acetazolamide.



Data

Systemic Disease	CMV Antigenemia	Duration of Corneal Endotheliitis* (mos)	Follow-up Period after CMV Detection (mos)
None	Negative	24	24
Uterus cancer (treated)	Negative	15	15
None	Negative	36	12
None	Negative	240	10
Cerebral infarction	Negative	3	3
None	Negative	28	9
None	Negative	25	8
None	Negative	2	2

treatment.

Table 3. Topical and Systemic Medications for Corneal Endotheliitis and Clinical Outcome

Patient No.	Affected Eye	Systemic Medication			Topical Medication			Clinical Outcome		
		Antiviral Drug	Steroid	Antiviral Drug	Steroid	Antibiotics	Slit-Lamp Findings	Corneal Endothelial Cell Density (cells/mm <sup>2</sup> )	VA	
1	Left	Ganciclovir, 5 mg/kg/day ×7 days	Betamethasone, 1 mg/day	0.3% acyclovir, 5 times a day	0.1% fluoromethorone, 4 times a day	0.5% levofloxacin, thrice daily	Clear cornea	247	20/60 (cataract)	
2	Right	Ganciclovir,* 10 mg/kg/day ×9 days	Betamethasone, 1 mg/day	0.3% acyclovir, thrice daily	0.1% dexamethasone, 4 times a day	0.5% levofloxacin, thrice daily	Bullous keratopathy	Undetectable	20/300	
3	Right	Valacyclovir, 1500 mg/day	Betamethasone, 0.5 mg/day	0.3% acyclovir, 5 times a day	0.1% betamethasone, 4 times a day	—	Bullous keratopathy	Undetectable	20/400	
4	Left	Ganciclovir, 10 mg/kg/day ×10 days	Betamethasone, 1 mg/day	0.3% acyclovir, 5 times a day	0.1% dexamethasone, 4 times a day	0.5% levofloxacin, thrice daily	Clear cornea	2600	20/60	
5	Right	Ganciclovir, 5 mg/kg/day ×10 days	—	0.5% ganciclovir, 6 times a day	0.1% fluoromethorone, 4 times a day	0.5% ofloxacin, 4 times a day	Clear cornea	1400	20/60	
6	Left	Ganciclovir, 10 mg/kg/day ×14 days	—	0.5% ganciclovir, 8 times a day	0.1% fluoromethorone, 4 times a day	0.5% levofloxacin, 4 times a day	Clear cornea	800	20/25	
7	Right	Ganciclovir, 10 mg/kg/day ×7 days	—	0.5% ganciclovir, 8 times a day	0.1% dexamethasone, 6 times a day	—	Clear cornea	884	20/20	
8	Right	Ganciclovir, 10 mg/kg/day ×15 days	—	0.5% ganciclovir, 8 times a day	0.1% fluoromethorone, 4 times/day	0.3% gatifloxacin, 4 times a day	Clear cornea	650	20/20	

VA = visual acuity.

\*Systemic ganciclovir treatment was started at 8 hrs after cytomegalovirus detection.



# シリコーンハイドロゲルコンタクトレンズの連続装用が 前眼部環境に及ぼす影響と安全性の検討

白石 敦 原 祐子 山口昌彦 大橋裕一

愛媛大学大学院感覚機能医学講座視機能外科学分野

## Evaluation of Ocular Surface Influence and Safety in Extended Wear of Newly Approved Silicone Hydrogel Contact Lens

Atsushi Shiraishi, Yuko Hara, Masahiko Yamaguchi and Yuichi Ohashi

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medicine, Ehime University

1週間連続装用のシリコーンハイドロゲルコンタクトレンズ (SHCL) がわが国で認可・発売されたが、連続装用については、まだ安全性を懸念する声も多い。そこで、SHCL 連続装用の安全性を検証する目的で、1日使い捨てソフトコンタクトレンズ (SCL)、頻回交換型 SCL、1カ月交換の終日装用 SHCL との間で多角的な比較評価試験を行った。結果として、実用視力、前眼部所見ならびに涙液安定性に関する1週間連続装用 SHCL の評価は、終日装用された他の従来型素材レンズ群と同等であった。一方、角膜厚に関しては、1カ月交換の終日装用 SHCL と同様、変化は認められず、従来型素材レンズの終日装用で有意の増加がみられたのとは対照的であった。使用後のレンズの一部からコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) が検出されたが、細菌量はいずれも臨床的に問題のないレベルであり、細菌の検出率 (陽性率) は1カ月交換の終日装用 SHCL と比較して有意に低かった。他方、付着脂質量は従来素材の SCL よりも有意に多く、逆に、付着蛋白質量は、1日使い捨て SCL よりも有意に少なく、1カ月交換の終日装用 SHCL よりも多かった。今回の検討から、新しい1週間連続装用の SHCL の安全性、有用性は、従来素材の SCL あるいは終日装用 SHCL と遜色ないものと考えられる。

A one-week extended-wear silicone hydrogel contact lens (1wSHCL) has been marketed in Japan, though negative opinions remain regarding the safety of extended wear. This study was designed to examine the clinical safety and utility of the 1wSHCL in comparison with three daily wear controls: a daily disposable soft contact lens (ddSCL), a 2-week replacement soft contact lens (2wSCL) or a monthly silicone hydrogel contact lens (mSHCL). No significant differences were observed between 1wSHCL and the control groups in terms of vision, slit lamp findings and tear stability analysis. Significant corneal swellings were observed in the two hydrogel CL groups, but not in the two SHCL groups. Some coagulase negative *Staphylococci* (CNS) species were detected in bacteriological examination of worn lenses, though all were far below bacterial infection level. The bacterial positive ratio in the 1wSHCL group was significantly lower than that in the mSHCL groups. As for lens deposits, both SHCLs absorbed significantly more lipids than did the ddSCL group. The 1wSHCL absorbed significantly less protein than did the ddSCL, but significantly more than the mSHCL. These results indicate that extended wear of this 1wSHCL is as safe and useful as existing daily wear SHCLs or SCLs.

[Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 25(12) : 1701-1707, 2008]

**Key words** : シリコーンハイドロゲルコンタクトレンズ、連続装用、角膜肥厚、涙液安定性、細菌、脂質、蛋白質、silicone hydrogel contact lens, extended wear, corneal swelling, tear stability, bacteria, lipids, proteins.

(別刷請求先) 白石 敦 : 〒791-0295 愛媛県東温市志津川 愛媛大学医学部感覚機能医学講座視機能外科学分野

Reprint requests : Atsushi Shiraishi, M.D., Ph.D., Department of Ophthalmology, Graduate School of Medicine, Ehime University, 454 Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, JAPAN

はじめに

連続装用コンタクトレンズ (CL) は、CLユーザーにとって利便性が高いため、潜在的なニーズはかなりのあるが、終日装用レンズに比較して、合併症、特に細菌性角膜炎の発生頻度が高いとの報告が多数みられる点で、眼科医は処方に消極的な傾向がある<sup>1,2)</sup>。

近年、高い酸素透過性と光学特性を有し、蛋白質の付着しにくいシリコンハイドロゲル (silicone hydrogel: SH) CL が登場した。これを受けて欧米では、1カ月連続装用 SHCL の安全性が臨床的に検証され<sup>3-5)</sup>、生活様式の面からオーバーナイト装用を必要とするユーザーを中心に定着しつつある。一方、連続装用期間は欧米より短いものの、1週間連続装用の SHCL がわが国においても承認・発売された。そこで、この新しい SHCL の1週間連続装用による安全性を、従来素材の終日装用ソフト CL (SCL)、および終日装用 SHCL を対照に、種々の角度から比較検討した。

## 1 対象および方法

### 1. 対象

2007年1月より10月まで愛媛大学病院眼科にて募集した SCL 既装用の成人ボランティア 60名を対象に以下に述べる比較試験を行った。しかし、表1に示すように被験レンズの1週間の連続装用の適性予備試験においては8名(14.7%)が不適ないし本人理由により試験に不参加となり、1名が検

表1 応募者・参加者と中止理由

	人数	理由
応募者	60	
予備試験不適	8	SPK 1. 本人理由 7
本試験参加者	52	
本試験中止	2	麦粒腫 1. 角膜の古斑 1
終了者	50	

SPK: 点状表層角膜炎。

査期間中に麦粒腫を発症、1名が検査不備のため本試験を中止した(表1)。結果、検査を完了した計50例100眼(男性30例、女性20例、平均年齢23.2±SD1.8)について統計学的に検討を行った。

### 2. コンタクトレンズ

被験レンズとして1週間連続装用 SHCL (Balafilcon A, 含水率36%, 以下 PV)、対照レンズとして1日使い捨て SCL (Etafilcon A, 含水率58%, 以下 OA)、2週間終日装用 SCL (HEMA, 含水率39%, 以下 MP) および1カ月終日装用 SHCL (Lotorafilcon A, 含水率24%, 以下 OX) を用いた。

### 3. 方法

試験は臨床検査と非臨床検査とに分けて行った。臨床検査では、レンズの使用期間の違いに基づいて試験 A と試験 B

表2 臨床試験デザイン

症例数	試料					臨床検査				
	名称	素材	FDA Group	製造元	使用方法	試験期間 (日)	使用日数 (1枚当り)	使用枚数 (サイクル)	装用時間 (1日当り)	ケアシステム
試験 A	PV (ビュアビジョン <sup>TM</sup> )	SH	3	B&L	連続装用	5~7	5~7	1		—
	MP (メダリストプラス <sup>®</sup> )	ハイドロゲル	1	B&L	終日装用	5~7	5~7	1	>6h	エーオーセプト
	OA (ワンデーアキュビュー <sup>®</sup> )	ハイドロゲル	4	J&J	終日装用	5~7	1	5~7	>6h	—
試験 B	PV (ビュアビジョン <sup>TM</sup> )	SH	3	B&L	連続装用	20~28	5~7	4		—
	OX (O <sub>2</sub> オプティクス)	SH	1	Ciba	終日装用	26~31	26~31	1	>6h	エーオーセプト

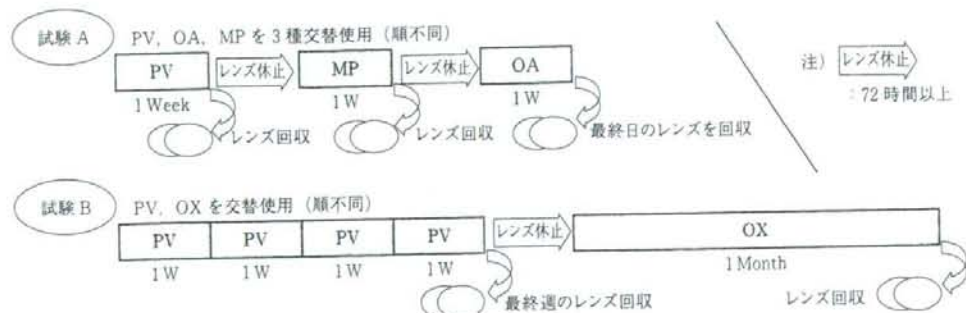


図1 試験概要のシェーマ



の2群に分け、それぞれクロスオーバー法で実施した。試験Aでは、被験レンズ(PV)、および対照レンズとして従来素材のSCLの2週間終日装用レンズ(MP)と1日使い捨て(OA)レンズを、それぞれの用法に準じ、1週間ずつ使用した。また、試験Bでは、被験レンズとSHCL終日装用(OX)の対照レンズとをそれぞれの用法に準じ、1カ月ずつ使用した(表2)。終日装用は1日6時間以上の装用とし、ケアシステム(MPとOXのみ)には過酸化水素消毒を使用した。予備試験と本試験の間、および本試験での被験レンズと対照レンズの間には、72時間以上の裸眼でのwash-out期間を設けた(図1)。非臨床検査では、検査日に装用していたレンズを回収し、右眼のレンズを細菌検査に、左眼のレンズを蛋白質/脂質定量検査に供用した。ただし、蛋白質および脂質の付着は装用中の蓄積によると考えられるため、本来の使用期間より短いMPに関しては蛋白質/脂質定量検査から除外した。

#### 4. 評価基準

##### a. 臨床検査

① 細隙灯顕微鏡検査：試験レンズ装用前、および試験最終日にレンズを外した直後の前眼部所見を観察した。角膜上皮障害に対してはフルオレセイン染色を用いて拡大率12倍にて観察し、上、下、左、右、中央の5象限の染色スコアを0~3点(角膜全体では0~15点)で評価した。

② 実用視力検査：装用開始直後と試験最終日に試験レンズ装用下での実用視力測定を行った。実用視力測定は、海道らの方法に則り1分間の平均視力を遠方視力(FVA)、対数

視力(logMAR)として評価し、測定開始時の視力に対する実用視力の比を視力維持率(VMR)として評価した<sup>6)</sup>。

③ 角膜厚検査：連続装用では酸素供給不足から起こる角膜浮腫の発生が懸念される。そこで、装用開始前および試験最終日にレンズを外した直後の角膜中心厚をPentacam(Oculus社)で測定した。

④ 涙液検査：装用開始直後と試験最終日にTear Stability Analysis System (TSAS, Tomey社)を用いてBreak-Up Index (BUI)を測定し、レンズ上の涙液の安定性を評価した。裸眼でのBUIは初回検査日に測定した。

##### b. 非臨床検査(回収レンズの検査)

① 微生物検査：試験終了時にレンズ(右眼)を回収し、(財)阪大微生物病研究会(吹田市)にて、細菌の同定・定量を行った。検査法をフローチャートに示す(図2)。

② 蛋白質定量：試験終了時にレンズ(左眼)を回収し、(株)東レリサーチセンター生物科学第2研究室(鎌倉市)にて、付着蛋白質ないし脂質の分析・定量を行った。ただし、全数ではなく、構成比を考慮してレンズごとに10~17検体数を抜粋して実施した。

蛋白質の測定は検体レンズを加水分解し、ニンヒドリン比色法によるアミノ酸分析法にて行った。具体的には、検体に6 mol/lの塩酸400  $\mu$ lを添加し、真空封圧下110°Cで22時間加水分解した。ついで、6 mol/l塩酸を別の試験管に移し、減圧乾固した後、水100  $\mu$ lに溶解、フィルター濾過後、アミノ酸分析計(日立L-8500形)で測定した。こうして得られたアミノ酸総量を検体レンズ1枚当たりの蛋白質量とし

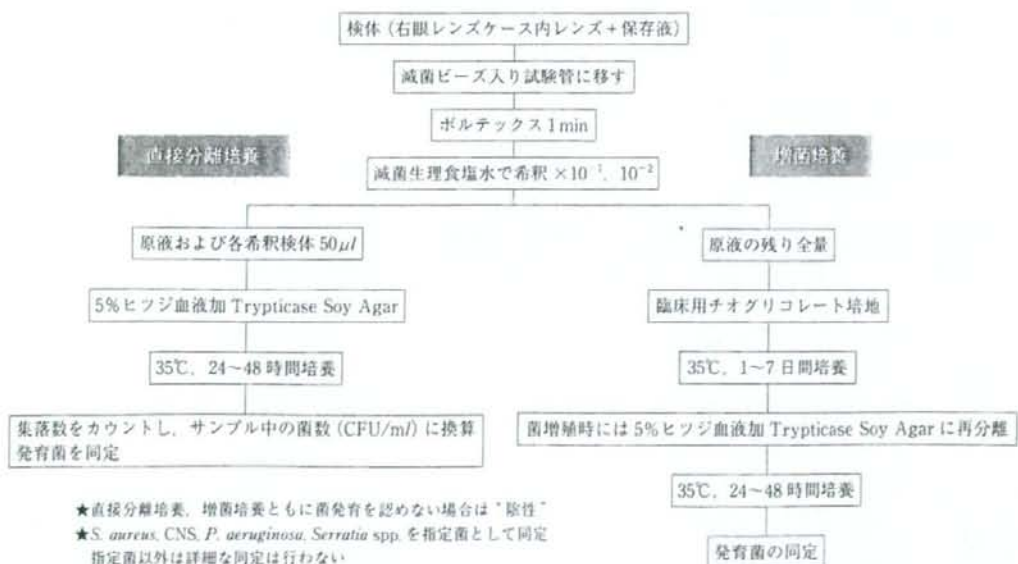


図2 微生物検査方法(提供:阪大微生物病研究会 坂本雅子氏)

た。

③ 脂質定量：検体レンズから溶媒抽出された脂質をメチルエステルに変換するガスクロマトグラフィー (GC) 定量分析にて測定した。具体的には、検体にクロロホルム/メタノール (1/1) 2 ml を添加して振盪し、溶媒抽出操作を行った。溶媒を除去した抽出脂質試料をメタノリシスするため、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 1 mg/ml メタノール溶液を 200  $\mu$ l、および 5% 塩酸・メタノール溶液 1 ml を加え、70°C で 3 時間加熱反応させて、試料中の脂肪酸および脂肪酸エステルを脂肪酸メチルエステルに変換した。ついで、ヘキサン 1 ml を加えてヘキサン層を回収し、ペンタデカン酸メチル 0.01% クロロホルム溶液 0.2 ml を加えて再溶解したものをガスクロマトグラフ HP5890 型 (Hewlett Packard 社) にて GC 分析した。こうして得られた脂肪酸総量を検体レンズ 1 枚当たりの脂質量とした。

## II 結 果

### 1. 臨床検査

#### a. 前眼部所見

試験 A においては、角膜上皮障害の発現眼数は OA 20 眼、MP 22 眼、PV 23 眼であり、角膜上皮障害発症眼における平均スコアでも OA 1.30 点、MP 1.27 点、PV 1.52 点と有意差は認めなかった。試験 B においては角膜上皮障害の発現眼数が PV 22 眼、OX 8 眼と OX において角膜上皮障害発症眼が有意に少なかったが、角膜上皮障害発症眼における平

表 3 角膜上皮障害

		SPK 発現症例数 (眼数)	発現症例の平均 Grade 数 (眼)	Grade 2 症例 (眼数)
試験 A	OA 1W	20	1.30	0
	MP 1W	22	1.27	1
	PV 1W	23	1.52	0
試験 B	PV 4W	22	1.14	2
	OX 1M	8	1.13	0

SPK : 点状表層角膜症

均スコアは PV 1.14 点、OX 1.13 点と障害の程度に差は認めなかった。スコア 3 点以上の上皮障害を認めた症例はなく、1 象限でスコア 2 点を認めた症例は試験 A では MP 1 眼、試験 B では PV 2 眼であった (表 3)。試験期間中に問題となる角結膜上皮障害、感染症などの前眼部所見は認めなかった。

#### b. 実用視力

試験 A、B を通じて、レンズ装用下での遠方視力 (FVA)、対数視力 (logMAR)、および視力維持率 (VMR) とともに、装用開始時と試験最終日との間で、いずれのレンズにおいても有意差はなかった (表 4)。

#### c. 角膜厚

試験 A において、従来素材の SCL (MP、OA) で有意な角膜厚の増加を認めた (MP :  $p < 0.05$ , OA :  $p < 0.01$ ) が、

表 4 実用視力

	PV (n=100)		OA (n=60)		MP (n=60)		OX (n=40)	
	装用開始時	装用期間後	装用開始時	装用期間後	装用開始時	装用期間後	装用開始時	装用期間後
実用視力 (FVA)	0.9475	0.9777	1.0830	1.0908	0.9281	0.9672	0.9990	1.0377
p 値	0.24		0.80		0.16		0.37	
実用視力 (LOG)	0.0404	0.0316	-0.0192	-0.0402	0.0353	0.0275	0.0273	-0.0025
p 値	0.50		0.10		0.71		0.19	
視力維持率 (VMR)	0.9294	0.9482	0.9687	0.9623	0.9438	0.9483	0.9528	0.9483
p 値	0.14		0.15		0.48		0.53	

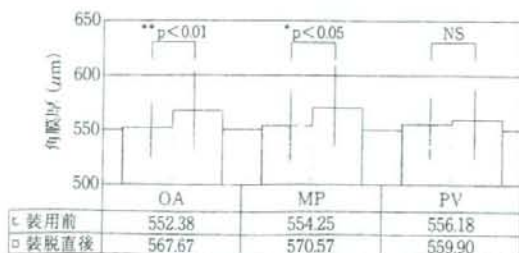


図 3 角膜厚検査 (1 週間, n=60 眼)

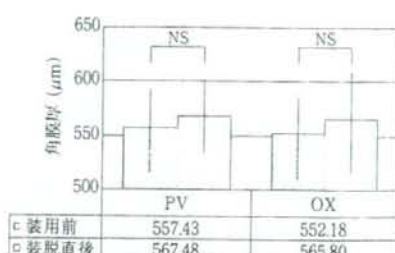


図 4 角膜厚検査 (4 週間, n=40 眼)



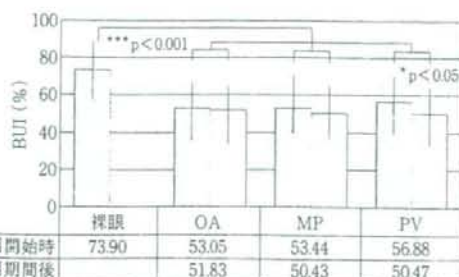


図5 BUI検査 (1週間, n=60眼)

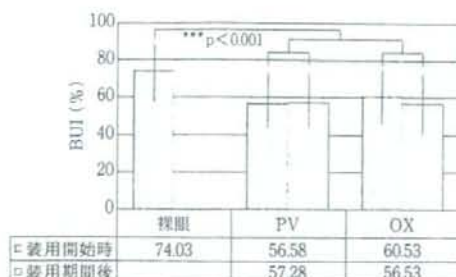


図6 BUI検査 (4週間, n=40眼)

表5 検体レンズから分離培養された微生物

試料名	検体数		Staphylococcus			指定外菌 (SA, PA, SM, CNS 以外)	Total	
			epidermidis	chromogenes	warneri		陽性検体数	陽性率
OA	30	陽性検体数 微生物量	1 <20 CFU/ml		1 100 CFU/ml	4 <20 CFU/ml	6	20.0%
MP	30	陽性検体数 微生物量	1 >20 CFU/ml				1	3.3%
PV	50	陽性検体数 微生物量	1 <20 CFU/ml	1 <20 CFU/ml			2	4.0%
OX	20	陽性検体数 微生物量				4 <20 CFU/ml	4	20.0%
統計/平均	130		3	1	1	8	13	10.0%

$\chi^2_{0.05}=7.815, p=0.0288<0.05$ .

SHCLでは有意な増加は認められなかった (PV:  $p=0.48$ ). 試験Bにおいて, SHCLの1週間連続装用 (PV 1週間×4サイクル) と終日装用 (OX) との間に有意差はなかった (図3, 4).

#### d. TSAS (BUI)

装用直後 (ベースライン) および試験最終日の BUI 値は, いずれのレンズにおいても SCL 装用前の裸眼値よりも有意に低下していた ( $p<0.001$ ). レンズごとにベースラインと試験最終日との BUI 値の比較では, PV で1週間後 (試験A) に有意に低下していたが, 4週間後 (試験B) ではベースラインとの間に差はなかった (図5, 6).

## 2. 非臨床検査

### a. 微生物検査

黄色ブドウ球菌, コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS), 緑膿菌, セラチアについて同定・定量を行い, これら以外の菌は指定外菌とした. A, B 両試験の全レンズ検体からは CNS が3種類 (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*) 5例同定された. 指定外菌が8例検出された. 指定外菌も含めた検出頻度 (陽性率) はレンズ間に有意な差が認められた ( $p<0.05$ ). ただし, いずれも 100 CFU/ml 以下であり, 一般的に CNS で起炎性をもつとされる  $10^6$  CFU/ml のレベルの菌量<sup>2)</sup>を大きく下回

るものであった (表5).

### b. 蛋白質定量

レンズ検体1枚当りの平均蛋白質量を18種類のアミノ酸

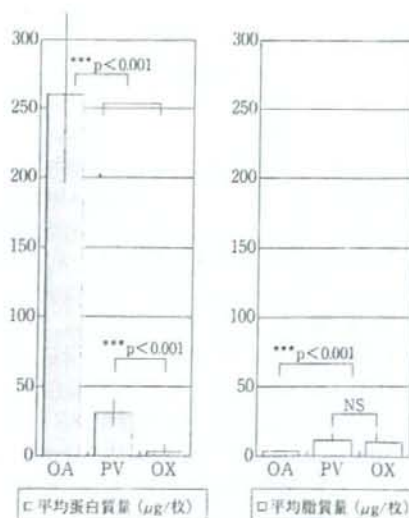


図7 レンズ付着蛋白質質量・脂質量

の総量として計測したところ、OAが260.31 $\mu$ g (n=12, SD=129.06), PVが31.11 $\mu$ g (n=17, SD=14.61), OXが3.36 $\mu$ g (n=10, SD=2.07)となり、OAが他のレンズに比べ有意に高かった (各p<0.001)。PVはOAよりも有意に低く、OXよりも有意に高かった (各p<0.001)。

### c. 脂質定量

レンズ検体1枚当りの平均脂質量を6種類の脂肪酸の総量として計測したところ、OAが3.06 $\mu$ g (n=10, SD=1.33), PVが11.48 $\mu$ g (n=13, SD=1.93), OXが10.25 $\mu$ g (n=10, SD=1.80)となった。連続装用のPVと終日装用のOXとの間に差はなかったが、両SHCLともOAと比較して有意に多かった (p<0.001) (図7)。

## III 考 察

CLの装用に伴って、角膜は種々の非生理学的な環境に晒されるが、このなかで、最も大きな課題は酸素供給の低下である。これを解決するために種々の素材の開発が行われてきたが、現在の処方主流である従来素材のSCLの場合には閉鎖時の酸素供給量を越える程度のレベルであり、オーバーナイト装用では低酸素状態により角膜浮腫をきたすとの報告もみられる<sup>8,9)</sup>。また、低酸素環境下では角膜上皮に細菌が付着しやすくなるという事実も報告されており<sup>10)</sup>、これを裏付けるように、従来素材のSCLの連続装用では、終日装用に比較して感染性角膜炎の発生頻度が高いとされている<sup>12)</sup>。このように、一般にCLの連続装用は感染発症の危険因子と考えられている<sup>10,11)</sup>が、近年登場したSHCLがその画期的な酸素透過性により<sup>12,13)</sup>、この課題を克服できるか否かは興味あるところである。

本試験においては、レンズの酸素透過性を最も鋭敏に反映する指標として角膜厚を取り上げ、CL装用前後の変動を比較した。その結果、従来素材のSCLの終日装用とは異なり、連続装用されたPVにおいては検査期間中(4週間)有意な角膜厚の増加は認められなかった。終日装用のOXにおいても同様の結果であり、SHCLの優れた酸素透過性が改めて実証される結果となった。これらの成績は海外における報告<sup>14)</sup>ともよく一致しており、SHCLでは、終日装用のみならず連続装用においても、角膜厚の増加をきたさないレベルで酸素供給が維持されているものと考えられ、酸素不足による角膜上皮障害の発生も少ないものと推測される。

連続装用でつぎに問題となるのがレンズの汚染である。実際、従来素材のSCLに比較してSHCLには細菌が付着しやすいとの報告も少なからずあるため<sup>15-17)</sup>、連続装用に伴う細菌付着の実態を明らかにしておくことは重要である。結論から言えば、汚染率は回収レンズ50枚のわずか2枚(4%)と当初の予想をはるかに下回るものであった。検出されたのはいずれもCNSであり、常在細菌叢由来と想定されるが、

細菌量はいずれも100CFU/ml以下であり、一般的にCNSの起炎閾値とされる10<sup>5</sup>CFU/mlのレベル<sup>7)</sup>には達しておらず、臨床的には問題とならない細菌量であった。一方で、菌の検出された頻度(陽性率)をみると、連続装用されたPV、終日装用MPとともに低く、1日使い捨てのOAと1カ月定期交換SHCLのOXにおいて比較的高かった。1日使い捨てのOAでは付着蛋白質質量が多いことから、レンズに付着した蛋白質の量が細菌の接着に影響した可能性が考えられ<sup>15,16)</sup>、OXは1カ月の終日装用であったため、使用期間の長さも関連している可能性もあり、追加研究での検討が必要であろう。

細隙灯顕微鏡による所見では、いずれのレンズにおいても、試験期間を通して問題となるような眼表面の障害は観察されず、安全性に問題はないと推測される。しかし、試験Bにおいて上皮障害の程度はOXとPV間で有意差はなく軽度の角膜上皮障害ではあったが、終日装用のOXに比較してPVで角膜上皮障害発症眼数が多く認められたことは、連続装用CLではより注意深い経過観察が必要であることを示唆する結果であろう。

装用レンズ上の涙液安定性は良好な視機能の維持において重要な因子であるが、本研究でも明らかのように、レンズ装用により低下することは避けられない現象である。涙液安定性をBUIにて評価したところ、装用4週間装用試験(試験B)においてPVはOXと同等の結果を示した。確かに、PVの場合、1週間装用試験(試験A)の装用後に有意な低下がみられ、同時に、PVの連続装用開始の最初の1週間に乾燥感が強いとの意見も少なからずある。実際、今回行った被験者に対するアンケート調査結果でも、PVに関する満足度(1:「低い」、7:「高い」の7段階評価)は、1週間後よりも4週間後のほうが良好で(mean score:1週間後4.8/4週間後5.7)、4週間後の満足度は終日装用で最も高い1日使い捨てOAと同等(5.8:1週間後)であった。すなわち、PVの連続装用の場合、装用後徐々にレンズに慣れて涙液の安定性が改善し、快適に使用できるようになるものと推察される。ただし、BUI値が40%未満の57眼(21.9%)については、その40.4%が乾燥感を訴えており、BUI値40%以上の203眼の26.6%に比較して頻度が高い。よって、ドライアイ症例に対しては、慎重に処方を行う必要があると思われる。

結論として、PVの1週間連続装用は、終日装用レンズと同等の安全性と有用性を有すると考えられる。従来素材のSCLによる連続装用でみられるような角膜厚の増加はなく、レンズ自体への細菌付着量、陽性率はともに低いレベルであり、海外における成績<sup>16)</sup>とよく一致していた。職業的な背景などからCL装用者のニーズは多岐にわたるため、連続装用を希望する患者は少なくない。1週間連続装用SHCLの登場により、CL処方の選択肢は広がったといえるが、その一



方で、患者のコンプライアンスも含めた長期的な安全性に関してはさらなる検証が必要であろう。PVの連続装用のメリットを最大限に生かすために、適切な患者選択と、コンプライアンス遵守に向けた地道な患者指導が不可欠である。

#### 文 献

- 1) Cheng KH, Leung SL, Hoekman HW et al: Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet* 354: 773-778, 1999
- 2) 日本眼科医会医療対策部:「日本コンタクトレンズ協議会コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査」について。日本の眼科 74: 497-507, 2003
- 3) Brennan NA, Coles ML, Comstock TL et al: A 1-year prospective clinical trial of balafilcon A (PureVision) silicone-hydrogel contact lenses used on a 30-day continuous wear schedule. *Ophthalmology* 109: 1172-1177, 2002
- 4) Lievens CW, Connor CG, Murphy H: Comparing goblet cell densities in patients wearing disposable hydrogel contact lenses versus silicone hydrogel contact lenses in an extended-wear modality. *Eye Contact Lens* 29: 241-244, 2003
- 5) Donshik P, Long B, Dillehay SM et al: Inflammatory and mechanical complications associated with 3 years of up to 30 nights of continuous wear of lotrafilcon A silicone hydrogel lenses. *Eye Contact Lens* 33: 191-195, 2007
- 6) 海道美奈子: 新しい視力計: 実用視力の原理と測定方法。あたらしい眼科 24: 401-408, 2007
- 7) 宮永嘉隆: 細菌一般論 (Q&A)。あたらしい眼科 17 (臨増): 3-4, 2000
- 8) Holden BA, Mertz GW: Critical oxygen levels to avoid corneal edema for daily and extended wear contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1161-1167, 1984
- 9) Solomon OD: Corneal stress test for extended wear. *CLAO J* 22: 75-78, 1996
- 10) Imayasu M, Petroll WM, Jester JV et al: The relation between contact lens oxygen transmissibility and binding of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea after overnight wear. *Ophthalmology* 101: 371-388, 1994
- 11) Solomon OD, Loff H, Perla B et al: Testing hypotheses for risk factors for contact lens-associated infectious keratitis in an animal model. *CLAO J* 20: 109-113, 1994
- 12) Ren DH, Petroll WM, Jester JV et al: The relationship between contact lens oxygen permeability and binding of *Pseudomonas aeruginosa* to human corneal epithelial cells after overnight and extended wear. *CLAO J* 25: 80-100, 1999
- 13) Cavanagh HD, Ladage P, Yamamoto K et al: Effects of daily and overnight wear of hyper-oxygen transmissible rigid and silicone hydrogel lenses on bacterial binding to the corneal epithelium: 13-month clinical trials. *Eye Contact Lens* 29 (1 Suppl): S14-16, 2003
- 14) Edmunds FR, Comstock TL, Reindel WT: Cumulative clinical results and projected incident rates of microbial keratitis with PureVision™ silicone hydrogel lenses. *Int Contact Lens Clin* 27: 182-187, 2000
- 15) Kodjikian L, Casoli-Bergeron E, Malet F et al: Bacterial adhesion to conventional hydrogel and new silicone-hydrogel contact lens materials. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246: 267-273, 2008
- 16) Santos L, Rodrigues D, Lira M et al: The influence of surface treatment on hydrophobicity, protein adsorption and microbial colonisation of silicone hydrogel contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye* 30: 183-188, 2007
- 17) Borazjani RN, Levy B, Ahearn DG: Relative primary adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* to HEMA-type contact lenses and an extended wear silicone hydrogel contact lens of high oxygen permeability. *Cont Lens Anterior Eye* 27: 3-8, 2004

\* \* \*

# 培養角膜上皮細胞のサイトカイン遺伝子発現に対する マルチパーパスソリューションの影響

今安正樹<sup>1,3</sup> 白石 敦<sup>\*2</sup> 大橋裕一<sup>\*2</sup> 島田昌一<sup>\*3</sup>

<sup>1</sup>(株)メニコン総合研究所 <sup>\*2</sup>愛媛大学医学部眼科学教室 <sup>\*3</sup>名古屋市立大学医学部第2解剖学講座

## Effects of Multipurpose Solutions on Cytokine Gene Expression of Corneal Epithelial Cells

Masaki Imayasu<sup>1,3</sup>, Atsushi Shiraiishi<sup>2</sup>, Yuichi Ohashi<sup>2</sup> and Shoichi Shimada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central R&D Lab., Menicon Co., Ltd., <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Ehime University,

<sup>3</sup>Department of Anatomy, Nagoya City University Medical School

**目的:** コンタクトレンズ用マルチパーパスソリューション (MPS) の角膜への影響を明確にするため、角膜上皮細胞を市販 MPS または配合成分で処理したときのサイトカイン遺伝子発現量および産生量を解析する。 **方法:** 培養ヒト角膜上皮細胞を用い、7種の MPS または配合成分を添加した培養液で 3, 6, 24 時間培養した。RNA を抽出し、サイトカイン遺伝子 [インターロイキン (IL)-8, トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- $\beta$ 2, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-6] 発現量を real-time polymerase chain reaction (PCR) 法で、培養上清中のサイトカイン産生量を抗体アレイで定量した。 **結果:** ホウ酸を含む MPS では IL-8, TGF- $\beta$ 2, IL-18, IL-6 の発現量が 3~6 時間後に増加し、その後減少した。これらの MPS では 24 時間後の IL-8 産生量も増加した。配合成分のなかでは、ホウ酸のみがサイトカイン遺伝子発現量を増加させた。 **結論:** MPS の配合成分であるホウ酸が炎症性サイトカインの産生に関与している可能性が示された。

In order to clarify the effects of multipurpose solutions (MPS) on the cornea, we analyzed the cytokine gene expression and protein level of corneal epithelial cells treated with MPS or ingredients. Human corneal epithelial cells were cultured for 3, 6 or 24 hours in medium containing commercially available MPS or ingredients. After RNA extraction, gene expressions of interleukin (IL)-8, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 2, IL-18, IL-1 $\beta$  and IL-6 were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR). Protein levels were determined by antibody array. MPS containing boric acid caused up-regulation of IL-8, TGF- $\beta$ 2, IL-18 and IL-6 after 3 and 6 hours, which then decreased at 24 hours. The MPS also promoted IL-8 production during 24 hour-incubation. Of the ingredients tested, only boric acid had significant effects on gene and protein expressions of inflammatory cytokines. These results demonstrate that boric acid may have significant effect on inflammatory cytokine production in corneal epithelial cells.

(Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 25(11):1567-1572, 2008)

**Key words:** 角膜上皮細胞, サイトカイン, マルチパーパスソリューション, コンタクトレンズ, corneal epithelial cells, cytokine, multipurpose solution, contact lens.

### はじめに

最近、ソフトコンタクトレンズ (SCL) ユーザーでの細菌性角膜炎の発症が問題になっており<sup>1)</sup>、マルチパーパスソリューション (MPS) の使用との関連性が議論されている<sup>2)</sup>。細菌性角膜炎の原因としては、MPS の不十分な殺菌効力<sup>3)</sup> やユーザーのコンプライアンスの低さ<sup>4)</sup> などが想定されるが、MPS の細胞毒性が角膜上皮細胞に及ぼす影響も考慮に

入れる必要がある。柳井ら<sup>5)</sup> は 14 種類の市販 MPS を比較し、主成分が同じポリヘキサメチルピグアニド (PHMB) であっても、添加剤の種類によって細胞毒性や殺菌効力が大きく異なることを報告した。一方、角膜上皮細胞は外傷を受けるなどのストレス状態にさらされると炎症性細胞を誘導するためにサイトカインを分泌することが知られている<sup>6)</sup>。毒性の強い MPS の使用は角膜にストレスを与えると考えられる

【別刷請求先】 今安正樹: 〒487-0032 愛知県春日井市高森台 5-1-10 (株)メニコン総合研究所

Reprint requests: Masaki Imayasu, Ph.D., Central R&D Lab., Menicon Co., Ltd., 5-1-10 Takamoridai, Kasugai-shi, Aichi-ken 487-0032, JAPAN



ため、サイトカイン遺伝子の発現量が増加する可能性が想定される。角膜上皮細胞のサイトカイン遺伝子発現を解析することにより、角膜へのストレスを高感度で定量的に評価できる方法が構築できると思われる。

そこで本論文では、ヒト角膜上皮細胞を、種々のMPS製品または配合成分を添加した培養液で培養し、MPSまたは配合成分を添加しない培養液で培養した場合とのサイトカイン遺伝子の発現量の差をreal-time polymerase chain reaction (PCR)法により定量的に解析した。また、蛋白質レベルでの評価のため、培養液中のサイトカイン産生量を抗体アレイで定量した。

## I 実験材料および方法

### 1. 実験材料

実験に使用したMPSとおもな配合成分を表1に示す。MPS-AからMPS-Gまでの7種類の市販MPSを用いた。主成分の殺菌剤にはPHMB、AlexidineまたはPolyquadが使用されている。このなかでMPS-AとMPS-B以外は緩衝剤としてホウ酸を含む。配合成分単独での実験に使用した成分名、濃度などを表2に示す。MPSに一般的に使用されている界面活性剤、殺菌剤、緩衝剤を実際の配合濃度に近い濃度で使用した。

表1 実験に使用した市販MPS

MPS	殺菌剤	界面活性剤	ホウ酸の有無
MPS-A	PHMB*	HCO**	-
MPS-B	PHMB	Poloxamer	-
MPS-C	PHMB	Tetronic	+
MPS-D	Alexidine	Poloxamer/ Tetronic	+
MPS-E	Polyquad	Tetronic	+
MPS-F	Polyquad	Tetronic	+
MPS-G	PHMB	不明	+

\* PHMB: polyhexamethylbiguanid.

\*\* HCO: PEG hydrogenated castor oil.

表2 実験に使用したMPS配合成分

配合成分	種類	濃度	製造元
HCO	界面活性剤	1.0%	日光ケミカルズ
Tetronic 1107	界面活性剤	1.0%	BASF Japan
Poloxamer 407	界面活性剤	1.0%	BASF Japan
Alexidine	殺菌剤	1ppm	Tronto Research
PHMB	殺菌剤	1ppm	アーケミカルズ
ホウ酸 (Boric acid)	緩衝剤	0.5%	日興製薬
		1.0%	

### 2. 実験方法

#### a. 培養細胞の準備

培養細胞として、SV40ウイルス感染により不死化し、ト角膜上皮細胞(以下、HCET細胞)<sup>7)</sup>を理化学研究所イバンクより購入して使用した。HCET細胞を6cm組織培養用ディッシュにコンフルエントになるまで培養した。培養液はDMEM/F12 (GIBCO)+5%ウシ胎仔血清(FBS)(GIBCO)を用いた。血清無添加の培養液に各種MPSまたは配合成分を10%添加した試験液を準備し、組織培養用ディッシュ4ml添加して37℃、5%CO<sub>2</sub>で3、6、24時間培養した。

#### b. 培養細胞からのRNAの抽出および定量

組織培養用ディッシュの培養液を捨て、冷PBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄後、1mlのTRIZOL<sup>®</sup>試薬(invitrogen)を添加した(氷冷下)。セルスクレーパーを用いてディッシュ表面に付着している細胞を剝離させた(氷冷下)。20ゲージの注射針を取り付けた2.5mlのシリンジで、TRIZOL<sup>®</sup>の吸引を20回程度くり返した後、1.5mlのマイクロチューブに回収した。以下、TRIZOL<sup>®</sup>試薬の取扱説明書に従ってtotal RNAを精製し、30μlのDEPC(diethylpyrocarbonate)処理水に溶解させた。

#### c. 逆転写反応およびreal-time reverse transcription (RT)-PCR

パーソナルスペクトルモニター(Amersham Bioscience GeneQuant pro)で260nmの吸光度を測定することによりRNA濃度を定量し、サンプル濃度を800ng/μlに調整しPrimeScript<sup>™</sup> RT reagents Kit (TaKaRa)の取扱説明書に従い、50μlの反応系にてcDNAに変換した。つぎSYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa)の取扱説明書に従って25μlの反応系にてreal-time PCRを行った(TaKaRa

表3 Real-time RT-PCRに使用したプライマーペアの塩基配列

ヒト遺伝子	F/R	プライマー塩基配列
β-actin	F	ATTGCCGACAGGATGCAGA
	R	GAGTACTTGCCTCAGGAGGA
IL-8	F	AAGGAACCATCTCACTGTGTGATAA
	R	ATCAGGAAGGCTGCCAAGAG
TGF-β2	F	GGATGCGCCTATTGCTTTA
	R	CATTTCCACCCTAGATCCCTCTT
IL-18	F	GCCACCTGTGCAGTCTACA
	R	ATCTGGAAGGCTTGAGGTTCCCTT
IL-1β	F	CCTCTGGATGGCGGCA
	R	TGCCTGAAGCCCTTGCTG
IL-6	F	AAAAAGGCAAAGAATCTAGATGCCAA
	R	GTCAGCAGGCTGGCATTGT

Fはセンス、Rはアンチセンスを示す。

TP800). サイトカインとしてIL-8, TGF- $\beta$ 2, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-6の5種類の遺伝子の発現量を解析した. ハウスキーピング遺伝子としては, 角膜上皮細胞での発現量が安定な $\beta$ -actinを選択し(予備実験で確認),  $\beta$ -actin発現量に対する各遺伝子の相対発現量を求めた. さらに, 各遺伝子について, MPS(または配合成分)処理群に対するPBS(+)処理群の相対発現量の比を求め, これを指標とした. なお, 各サイトカイン遺伝子および $\beta$ -actinのreal-time PCR用プライマーはNCBI(National Center for Biotechnology Information)の遺伝子データベースよりmRNAの塩基配列を検索し, Primer Express(Applied Bio)でプライマーペア候補を検索し, イントロンをはさんだ配列を選択して, Sigma Genosys社に合成を依頼した. プライマーペアの塩基配列を表3に示す. なお, 実験は独立して3回くり返し, 平均値と標準偏差を求めた.

#### d. 抗体アレイによる培養上清のサイトカイン産生量の定量

24時間培養した細胞については培養液を回収し, そのままサイトカイン産生量定量に供試した. アレイ基板としてBS-X1324(住友ベークライト)を使用し, 抗ヒトIL-8マウスモノクローナル抗体(BIOSORCE), 抗ヒトIL-6マウスモノクローナル抗体(ENDOGEN), 抗ヒトTGF- $\beta$ 2マウスモノクローナル抗体(RDS)のプロットを住友ベークライトに依頼した. 抗体アレイチャンバー(GenTel, 12well)に抗体アレイを固定し, 培養液を50 $\mu$ l添加して室温で1時間振盪した. PBSで洗浄後, 3種類のサイトカインに対するビオチン化抗体混合液[抗ヒトIL-8ビオチン化抗体(BIOSOURCE), 抗ヒトIL-6ビオチン化抗体(ENDOGEN), 抗ヒトTGF- $\beta$ 2ビオチン化抗体(RDS)]を調整し, 50 $\mu$ l添加して室温で1時間振盪した. PBSで洗浄後, Cy5標識ストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch)50 $\mu$ lを添加

し, 室温で1時間振盪した. PBSで洗浄後, 乾燥させ, フレイスキャナー(GSI Luminoc, ScanArray 5000)でCy5蛍光画像を取得した. 各プロットの蛍光強度をアレイ用画像処理ソフト(Scan Alyze)で数値化した. 各サイトカインの標準液としてヒトIL-8(Acris), ヒトIL-6(Acris), ヒトTGF- $\beta$ 2(Acris)を5, 10, 20, 40, 80pg/mlに調整して用いた. なお, 実験は独立して3回くり返し, 平均値と標準偏差を求めた.

## II 結 果

### a. サイトカイン遺伝子発現に対するMPSの影響

MPSで3, 6および24時間処理したときの対照[PBS(+)]に対するサイトカイン遺伝子発現比を図1a, bおよびcに示す. MPS処理3時間後ではMPS-C~GでIL-8が

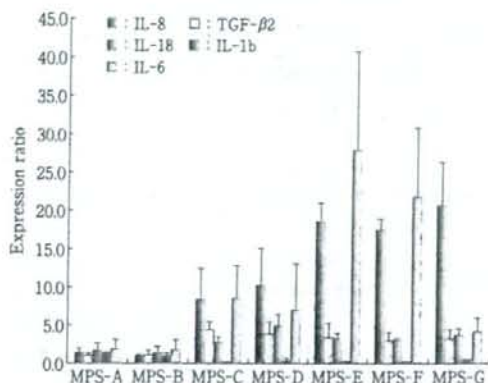


図1b MPSで6時間処理したHCET細胞のサイトカイン遺伝子発現比  
対照[PBS(+)]に対する発現比を示す.

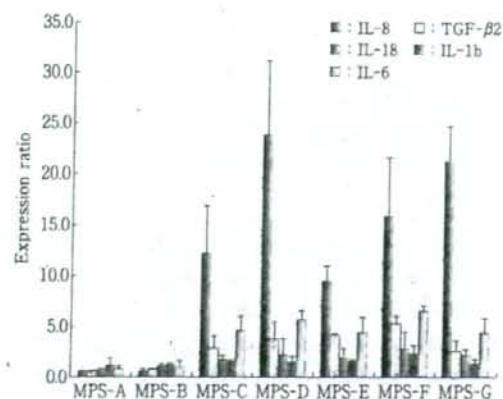


図1a MPSで3時間処理したHCET細胞のサイトカイン遺伝子発現比  
対照[PBS(+)]に対する発現比を示す.

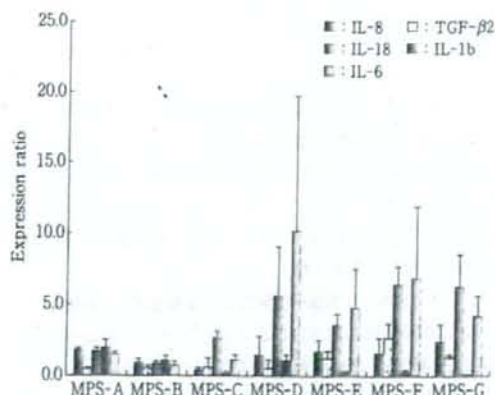


図1c MPSで24時間処理したHCET細胞のサイトカイン遺伝子発現比  
対照[PBS(+)]に対する発現比を示す.



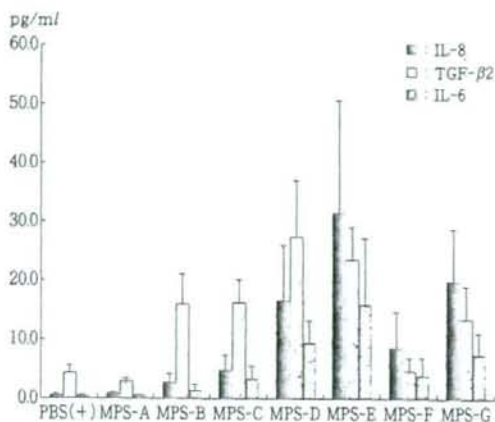


図2 MPSで24時間処理したHCET細胞のサイトカイン産生量

約10~25倍に増加した。TGF-β2およびIL-6も増加した。一方、MPS処理6時間後においても、MPS-C~GではIL-8が高いレベルを維持したが、特にMPS-E~Gが約20倍高い発現量を示した。MPS-EおよびMPS-FではIL-6が約20~30倍に増加した。MPS処理24時間後においては、全体的にサイトカイン発現比はかなり回復し、特にMPS-Cではほぼ正常レベルになった。MPS-D~GではIL-8は回復したが、IL-18とIL-6が約5~10倍高いレベルを維持していた。すべての処理時間において、MPS-AおよびBではすべてのサイトカイン遺伝子に関し、発現量の増加は認められなかった。すべてのMPS処理において、IL-1βの発現量増加は認められず、IL-8の発現量増加をもたらしたMPS-C~Gではむしろ発現量が減少する傾向を示した。

#### b. サイトカイン産生量に対するMPSの影響

培養24時間で産生されたサイトカイン(IL-8, TGF-β2およびIL-6)を抗体アレイで定量した結果を図2に示す。対照のPBS(+)でのサイトカイン産生量はIL-8が $0.5 \pm 0.2$  pg/ml, TGF-β2が $4.3 \pm 1.3$  pg/ml, IL-6が $0.3 \pm 0.2$  pg/mlであった。対照と比較してMPS-Aではサイトカイン産生量の増加は認められなかったが、MPS-BおよびCではTGF-β2の増加が認められた。MPS-D, EおよびGでは3種のサイトカインすべてが増加した。MPS-FではIL-8が増加した。全体的にサイトカイン産生量が最も大きく増加したのはMPS-Eであった。

#### c. サイトカイン遺伝子発現に対する配合成分の影響

図1で示されたMPSによるサイトカイン遺伝子発現量の増加がMPSのどの配合成分によるかを明確にするため、配合成分単独での遺伝子発現に対する影響を検討した。配合成分処理3時間および24時間後の結果を図3aおよび3bに示す。3時間処理では、配合成分のなかでホウ酸のみがIL-8,

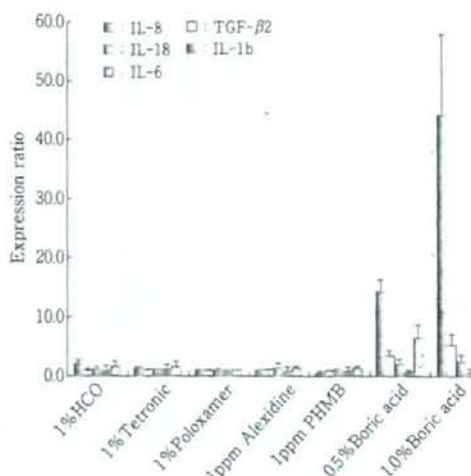


図3a 配合成分で3時間処理したHCET細胞のサイトカイン遺伝子発現比  
対照(PBS(+))に対する発現比を示す。

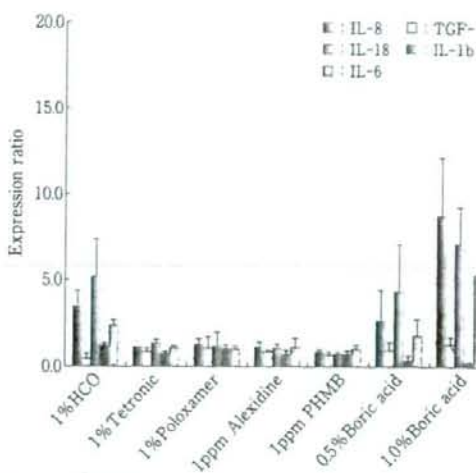


図3b 配合成分で24時間処理したHCET細胞のサイトカイン遺伝子発現比  
対照(PBS(+))に対する発現比を示す。

TGF-β2, IL-6発現量を増加させ、1%濃度ではそれぞれ45倍、5倍、15倍となった。24時間後では1%ホウ酸の効果は3時間と比較してかなり回復したが、IL-8およびIL-1bはまだ高いレベルを維持しており、IL-18発現量への影響みられた。1% HCOは0.5%ホウ酸と同程度の効果を示し、

#### d. サイトカイン産生量に対する配合成分の影響

配合成分単独で24時間作用させたときのサイトカイン産生量への影響を検討した結果を図4に示す。界面活性

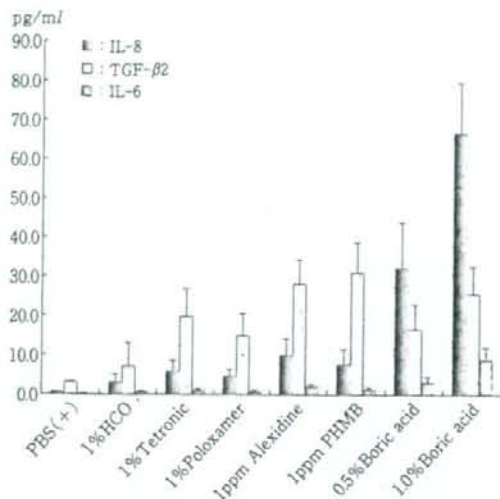


図4 配合成分で24時間処理したHCET細胞のサイトカイン産生量

(HCO, Tetriconic および Poloxamer) および殺菌剤 (Alexidine および PHMB) は TGF-β2 産生量を有意に増加させた。ホウ酸は濃度依存的に IL-8 産生量を増加させ、1% 濃度では約 70 pg/ml にも達した。TGF-β2 産生量への影響も認められた。

### III 考 按

今回、ヒト角膜上皮細胞への MPS 投与で変化する可能性のあるサイトカイン遺伝子として IL-8, TGF-β2, IL-18, IL-1β, IL-6 を採択した。予備実験においてはその他のサイトカインとして IL-1α, IFN-γ, TNF-α なども検討したが、変化が少なかったため対象から除外した。MPS の影響としては、3 時間後に IL-8 が、6 時間後に IL-8 に加えて IL-6 が、24 時間後には IL-6 と TGF-β2 の発現量増加が目立った。IL-8 および IL-6 が増加した MPS では、IL-1β の発現量が減少していた。Xue ら<sup>9)</sup> が報告しているように、IL-1 は IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインの産生を促進する急性のサイトカインであるため、IL-6・IL-8 の増加によるフィードバック制御によって、経時的に発現量が下がったと考えられる。TGF-β2 は角膜上皮細胞の増殖、遊走、分化、接着制御など多くの生理作用をもつサイトカインであり、角膜上皮創傷治癒過程において発現量が増加することが知られている<sup>9)</sup>。また、IL-18 はマウス角膜に緑膿菌を感染させたときに、24 時間後以降に発現量が増加することが知られている<sup>10)</sup>。今回の実験においては、TGF-β2 と IL-18 は 6~24 時間と長時間作用させた場合に発現量が増加しており、外傷や細菌感染などの重篤な障害で初めて発現するサ

イトカインと考えられる。

7 種類の MPS を比較すると、MPS-A および MPS-B ではサイトカイン遺伝子の変化が認められなかったが、MPS-C, MPS-D, MPS-E, MPS-F および MPS-G では IL-8, TGF-β2, IL-6 において顕著な発現量増加を示した。前 2 者の MPS がホウ酸を含まないのに対し、後 5 者がホウ酸を含むことより、ホウ酸がサイトカイン遺伝子発現に関与した可能性が考えられる。そこで、代表的な MPS 配合成分 7 種類を選択してサイトカインへの影響を検討したところ、ホウ酸のみが顕著な影響を示し、IL-8, IL-6 遺伝子発現量を増加させた。また、抗体アレイによるサイトカイン産生量の測定実験においても、ホウ酸を含む MPS および 0.5~1.0% のホウ酸が 24 時間後のサイトカイン産生量を増加させることを確認した。ホウ酸が実使用濃度よりも低い 0.1% で細胞毒性を有することは、Santodomingo ら<sup>11)</sup> の V79 細胞を用いたコロニー形成阻害試験により報告されている。今回の実験ではサイトカイン遺伝子発現および産生量の増加として細胞毒性が検出されたと考えられる。

一方、筆者らは角膜上皮細胞のタイトジャンクション (特に ZO-1) に対する MPS の影響を細胞生物学的および電気生理学的手法で検討し、配合成分にホウ酸を含む MPS のみがタイトジャンクションの構造を破壊することを報告している<sup>12)</sup>。サイトカイン遺伝子発現の増加がタイトジャンクションの構造破壊をひき起こすメカニズムの詳細は不明であるが、IL-1 や IL-8 などの炎症性サイトカインはストレス応答性の MAPK (mitogen-activated protein kinase) の活性化をひき起こすことが知られており、MAPK カスケードなどの細胞内シグナル伝達系の活性化を通してタイトジャンクションが破壊されたと考えられる<sup>13)</sup>。角膜上皮最表層細胞のタイトジャンクションは角膜のバリア機能においてきわめて重要な役割を担っているため、その構造破壊は緑膿菌などの病原菌の角膜への侵入を容易にし、細菌性角膜炎感染のリスクを増大させると考えられる<sup>1)</sup>。すなわち、コンタクトレンズ装用とケア用品 (特に MPS) 使用による細菌性角膜炎感染のリスクをなるべく低くするには、角膜上皮細胞のサイトカイン遺伝子発現への影響の少ない MPS を選択し、角膜バリア機能をなるべく健全に保つことが重要と考えられる。

### 文 献

- 1) 大橋裕一, 鈴木 崇, 原 祐子ほか: コンタクトレンズ関連細菌性角膜炎の発症メカニズム, 日コレ誌 48: 60-67, 2006
- 2) Inoue N, Toshida H, Mamada N et al: Contact lens-induced keratitis in Japan. *Eye Contact Lens* 33: 65-69, 2007
- 3) Levy B, Heiler D, Norton S: Report on testing from an investigation of *Fusarium* keratitis in contact lens wear-