

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791692

研究課題名（和文） 角膜傷害診断機の開発

研究課題名（英文） Development of Diagnostic Device for Corneal Impairment

研究代表者

上松 聖典（ UEMATSU MASAFUMI ）

長崎大学・病院・助教

研究者番号：30380843

研究成果の概要（和文）：角膜傷害診断機の開発を進め臨床応用できる測定機を作製し、国際特許を申請した。この測定機により角膜障害測定に成功した。また、この測定原理を用いて点眼薬防腐剤の角膜毒性を解析した。

研究成果の概要（英文）：A novel diagnostic device for corneal impairment was developed and manufactured, which is applied for an international patent. Measurement of corneal impairment was succeeded using the device. Furthermore, corneal toxicity due to an eyedrop preservative was able to be evaluated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000		900,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000		3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：角膜・バリア機能・角膜上皮障害・塩化ベンザルコニウム・毒性試験

## 1. 研究開始当初の背景

角膜にはバリア（障壁、関門）機能が備わっており、外部から眼への侵入を防いでいる。角膜は傷害を受けやすく、軽度の角膜傷害が重篤な眼疾患の誘因となるため、眼科診療において角膜傷害の評価は非常に重要である。特に角膜疾患を診療するにあたり、角膜傷害の程度を定量することは有用であると考えられるが、角膜傷害を定量的に測定する方法は、今までほとんど無かった。

## 2. 研究の目的

申請者は角膜傷害を定量するため、優れたバリア機能測定法である、経上皮電気抵抗値（Transepithelial Electrical Resistance,

TER）測定に着目した。角膜傷害をバリア機能の低下で評価するものである。TER は in vitro で角膜傷害を定量することができ、原理的に in vivo でも測定可能で、臨床応用も可能である。申請者はこれまでの研究で初めてヒトでの角膜傷害を TER で定量化することに成功した。この原理を元に、新しい角膜傷害診断機を開発するのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

## (1) 電極の改良

電極・電導体の最適な素材を検索し、眼球接触チップ型の形状に形成する。東北大学工学部等と協力する。ヒトにおいて使用する際

は、感染予防のため、電極を測定毎に滅菌するか、可能であれば電極をディスポーザブルにする。

#### (2) 電極の安全性と安定性の確認

生体における電極の安全性と安定性を確認する。具体的にはウサギ角膜で上記電極を使用し、電圧抵抗計 EVOMX™ で±20 μA, 12.5Hzの矩形波電流にて5分間TERを測定する。1分毎に測定値の変動、分極の有無を確認し、装置をはずした後に細隙灯で角結膜傷害の有無をみる。電極の安全性と安定性を確認した上で、ヒトに適用できるか、倫理委員会の審議を受ける。

#### (3) 正常角膜のバリア機能測定

開発した電極を用いて、健常成人の角膜のバリア機能をTERで測定する。具体的には、健常成人ボランティアを募集し、倫理委員会に承認を受けた説明書での説明の後、同意を得たものを対象とする。細隙灯検査にて角膜の状態をスコア化し、涙液破壊時間を測定した後、電極を装用させ、電圧抵抗計にて±20 μA, 12.5Hzの矩形波電流にて数秒間TERを測定する。

#### (4) 有疾患眼の角膜バリア機能測定

角膜疾患の角膜バリア機能を上述の方法にてTERにて測定する。角膜疾患にはドライアイ、コンタクトレンズ装用眼、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜潰瘍、角膜感染症、角膜変性、角膜移植眼などが含まれる。これらの疾患を有する患者からインフォームドコンセントを得た上で測定を行う。

#### (5) 点眼薬の角膜傷害評価

点眼薬の防腐剤である塩化ベンザルコニウムには角膜傷害性がある。これを含む点眼薬を点眼し角膜傷害をTERで測定する。薬剤間で角膜傷害性に違いが無いか検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 電極の改良

角膜傷害診断機は、東北大学工学部および、日本光電工業株式会社、株式会社メニコンといった医療機器メーカーと共同で開発した。

##### ①電導体の成型

導電体はポリビニルアルコール (PVA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (Poly-HEMA)、AMPS、アテロコラーゲン候補として、生体安全性、導電性、弾性、易成型性を検討し、最終的にPVAが最適であることが分かった。さらにPVAは凍結解凍を繰り返すのみでゲル化し、滅菌も可能であることから電極の導電体としては最適であり、PVAにより導電体を成型した。

##### ②絶縁体の成型

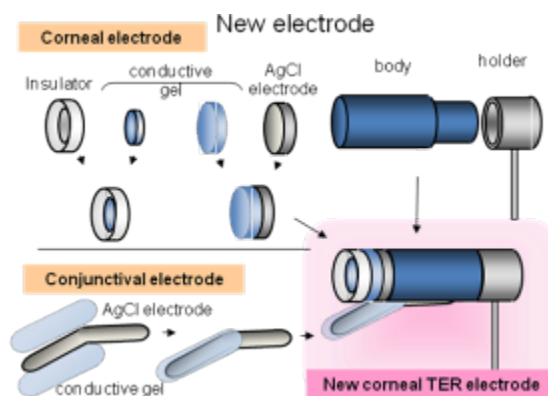
導電体はシリコーンゴム、軟質アクリル、シリコーンハイドロゲルを候補として、生体安全性、絶縁性、弾性、易成型性を検討した。最終的に軟質アクリルが最適であることが分かった。さらに軟質アクリルは3D成型が可能であり、滅菌も可能であることから電極の絶縁体としては最適であり、軟質アクリルにより絶縁体を成型した。

##### ③電極の成型

上記導電体、絶縁体、銀塩化銀電極、ポリイミド、コネクタ基盤、リード線、モジュージャックを一体化した電極を作製した。これにより眼科診察用の細隙灯の眼圧測定機に容易に搭載することが可能となり、測定も数秒間で簡単にできるようになった。

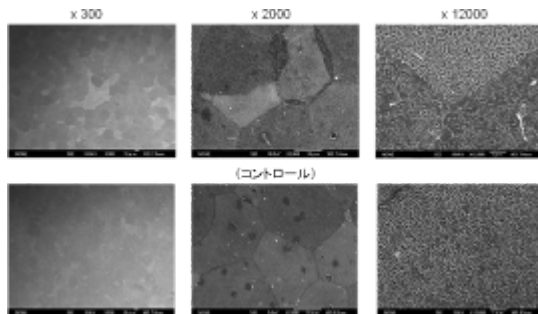
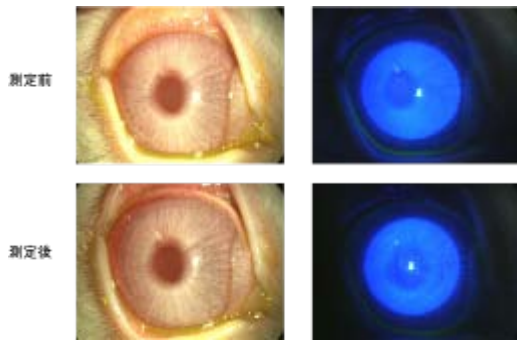
##### ④電極の滅菌

臨床応用に際しては角膜接触部の滅菌が必要不可欠であり、電子線滅菌、オートクレーブ、EOG滅菌、過酸化水素滅菌を検討し、電子線滅菌が最適であることが分かった。また、電極を密閉しそのまま電子線滅菌することで生体接触面への無菌的な使用が可能となった。



#### (2) 電極の安全性と安定性の確認

生体における電極の安全性と安定性を確認した。具体的にはウサギ角膜で上記電極を使用し、電圧抵抗計 EVOMX™ で±20 μA, 12.5Hzの矩形波電流にて5分間TERを測定し、1分毎に測定値の変動、分極の有無を確認し、装置をはずした後に細隙灯で角結膜傷害の有無を検討した。また、走査型電子顕微鏡で測定前後の角膜表面を観察し、角膜表層細胞の変化を観察した。細隙灯検査と電子顕微鏡ともに、TER測定後角膜上皮の障害はほとんど見られなかった。電極の安全性と安定性が確認された為、ヒトに適用するため倫理委員会の審議を受け承認を得た。

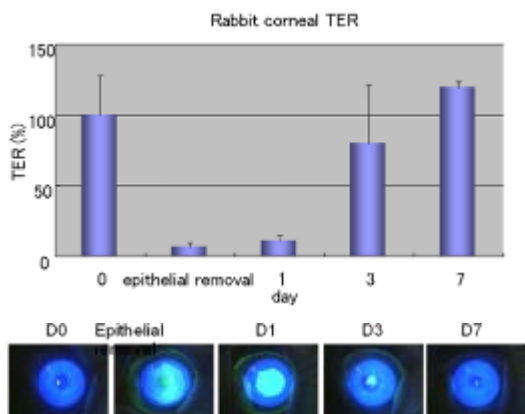


### (3) 正常角膜のバリア機能測定

開発した電極を用いて、健常成人の角膜のバリア機能をTERで測定した。成人男子での角膜TERの値は $1257 \pm 311 \text{ ohm cm}^2$ であった。

### (4) 有疾患眼の角膜バリア機能測定

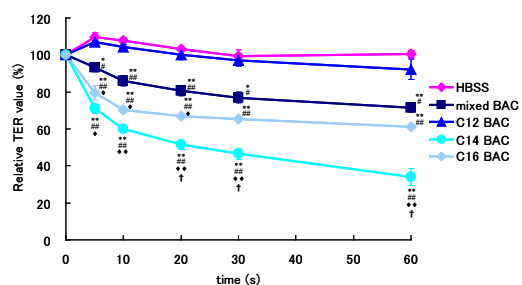
角膜疾患の角膜バリア機能は、患者における測定が望まれたが、測定装置が完成してからの当該患者数が少なく評価するには不十分であったため、ウサギにおける角膜びらんの評価を行った。角膜びらんでは角膜TERは $6.4 \pm 3.1\%$ に減少した。経過観察すると角膜びらんが回復するにつれTERも改善し、1, 3, 7日後にはそれぞれ $10.8 \pm 4.0\%$ 、 $80.0 \pm 41.6\%$ 、 $119.4 \pm 4.3\%$ となった。角膜障害測定装置で角膜疾患の角膜バリア機能を定量的に評価することが可能であることが示された。



### (5) 点眼薬の角膜傷害評価

点眼薬の防腐剤である塩化ベンザルコニウム含むラタノプロスト点眼薬 (0.02%塩化ベンザルコニウムを含む) を点眼し角膜傷害をTERで測定した。投与1分後に角膜TERは投与前の $73.0 \pm 25.9\%$ と有意に減少した。これはウサギ角膜に1分間同薬を暴露し続けた実験のデータよりも高い数値であり、涙液のターンオーバーによる薬剤の希釈の影響が示唆された。

また、炭素差数の異なる塩化ベンザルコニウム(BAC)の急性角膜上皮障害を比較し、C12 BACの急性角膜傷害が軽度であることを示した。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Uematsu M, Kumagami T, Shimoda K, et al. Influence of alkyl chain length of benzalkonium chloride on acute corneal epithelial toxicity. *Cornea*; 29(11): 1296- 1301. 2010. 査読あり

[学会発表] (計2件)

① Uematsu M, Tanaka Y, Sekine S, et al. A novel in vivo corneal trans-epithelial electrical resistance measurement device. Association for Research and Vision and Ophthalmology, 2011 Annual Meeting. 2011年5月. アメリカ合衆国.

② 上松聖典、手嶋無限、市丸哲郎ら. ラタノプロスト製剤による角膜バリア機能の変化. 第115回日本眼科学会総会. 2011年5月. 東京.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：角膜経上皮電気抵抗値の測定方法  
( Method of Measuring Electrical Resistance  
Value of Corneal Trans-Epithelium )

発明者：上松聖典、北岡隆、西田幸二ら

権利者：長崎大学 東北大学

種類：

番号：09717554 (EPC) 12/921,069 (アメリカ)

特願2010-501917 (日本)

出願年月日：H21年3月3日 (H22年7月にJSTのPCT  
出願支援決定)

国内外の別：日本・アメリカ合衆国・ヨーロ  
ッパ・

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[www.med.nagasaki-u.ac.jp/opthtml/](http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/opthtml/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上松 聖典 ( UEMATSU MASAFUMI )

長崎大学・病院・助教

研究者番号：30380843

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし