

エキシマレーザー照射後の角膜内皮細胞の組織学的検討

伊東眞由美, 高橋 次郎, 伏見 典子, 崎元 卓, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

要 約

家兎眼にエキシマレーザー照射を施行し, 照射後早期の角膜内皮細胞の変化を組織学的に検討した。透過型電子顕微鏡を用いた観察では, 照射 48 時間後, 内皮細胞が変形し, デスメ膜側の内皮細胞膜に大小の間隙が形成され, 細胞間隙が開大した所見が認められた。60 時間後, 内皮細胞質内の電子密度に前房側とデスメ膜側で差がみられた。電子密度の高い物質がデスメ膜側の内皮細胞膜の陥凹に接して認められた。しかし, 72 時間後には内皮細胞質内の電子密度は均一となり, 内皮細胞の形態は正常な所見を呈し, 電子密度の高い物質はデスメ膜内に認め

られた。家兎眼におけるエキシマレーザー照射後, 可逆的ではあるが内皮細胞に形態学的変化が生じたことから, エキシマレーザー照射の角膜深部組織への影響が考えられ, 臨床例においてもエキシマレーザー照射後の角膜内皮細胞の経過観察は重要であることが考えられた。(日眼会誌 101: 801-807, 1997)

キーワード: エキシマレーザー, 角膜屈折矯正手術, 角膜内皮

Histological and Ultrastructural Study of Corneal Endothelium after Excimer Laser Ablation in Rabbit

Mayumi Ito, Jiro Takahashi, Noriko Fushimi, Takashi Sakimoto and Mitsuru Sawa

Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

Abstract

To investigate the effect of excimer laser ablation on the corneal endothelium in the early period, an excimer laser ablation was performed on rabbit cornea. Electron microscopy revealed an irregular space in the endothelial membrane facing Descemet's membrane 48 hours after the laser ablation. At 60 hours, electron-dense material was observed between the endothelial cells and Descemet's membrane. At 72 hours, electron-dense material was observed in Descemet's membrane, but no mor-

phologic change was observed in the endothelium. These results suggest that excimer laser ablation may affect reversible corneal endothelium and it is important to perform a long-term follow-up of the corneal endothelium after excimer laser ablation in humans. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 801-807, 1997)

Key words: Excimer laser, Photorefractive keratectomy, Corneal endothelium

I 緒 言

近年, 本邦においてもエキシマレーザー角膜屈折矯正手術(photorefractive keratectomy, PRK)の臨床治験が多数の施設で行われ, その屈折矯正効果および臨床経過についての報告^{1)~3)}が行われている。レーザー照射後の角膜内皮細胞に対する影響については, 現在まで問題点は生じていないとの報告^{4)~7)}が多く, エキシマレーザーの角膜組織に対する安全性については一応の評価を受けていると考えられる。しかし, 抗精神薬服用者に対す

る PRK 後, 内皮細胞の減少を認めたとの報告⁸⁾があり, レーザー照射の内皮細胞への影響が改めて注目されている。一方, 家兎眼を用いた実験では, レーザー照射後にデスメ膜内に高電子密度の物質が生じることが報告^{9)~11)}されている。しかし, その物質の発生機序および経過については明らかにされていない。今回著者は, 本物質の発生機序を検討するために, 家兎眼に対してエキシマレーザー照射を行い, レーザー照射後早期の角膜内皮を形態学的に観察した。

別刷請求先: 173 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 伊東眞由美
(平成9年3月21日受付, 平成9年6月5日改訂受理)

Reprint requests to: Mayumi Ito, M.D. 30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan
(Received March 21, 1997 and accepted in revised form June 5, 1997)

II 実験方法

成熟白色家兎(体重約3.0~4.0 kg)10匹20眼を用いて実験を行った。ペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)静脈麻酔後、スパーテルで角膜中央から周辺に向かい直径約5.5 mmの上皮剥離を行い、エキシマレー

ザー発生装置(ExiMed UV 200-LA, Summit社)を用い、本装置における9 D相当のPRKプログラムでの照射を行った。照射は片眼ずつ時期をずらして行った。照射条件は、照射径4.5 mm, 周波数10 Hz, エネルギー密度180 mJ/cm², 角膜実質切除率0.25 μ m/pulseとした。この照射条件における9 Dの照射は、約70 μ mの切除深度

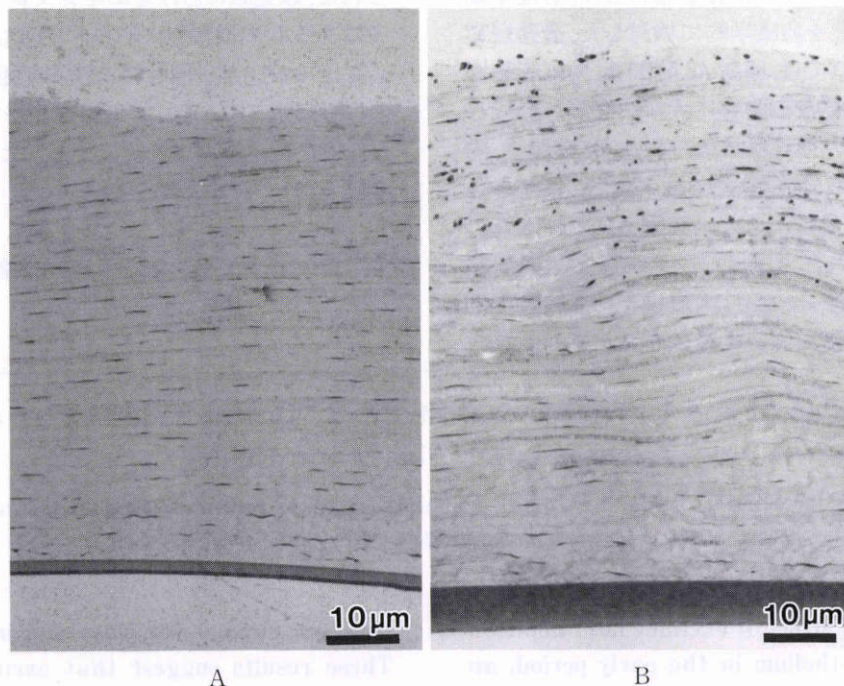


図1 照射後の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色)。

A: 照射直後, B: 照射24時間後, 実質上層部に炎症細胞の浸潤を認める。内皮細胞は正常な形態を呈している。

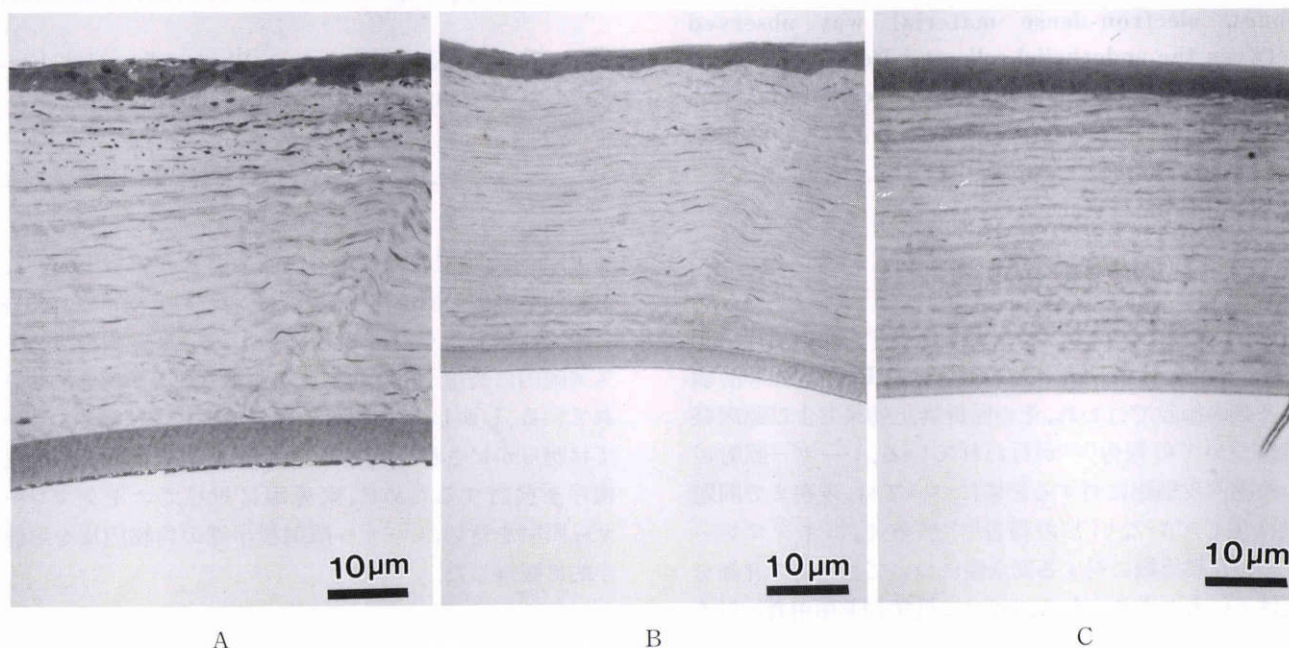


図2 照射後の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色)。

A: 照射48時間後, ほぼ上皮は修復している。実質内の炎症細胞浸潤が認められる。内皮細胞には間隙が認められる。B: 照射60時間後, 内皮細胞の接合部は正常な状態を呈している。C: 照射72時間後, 上皮細胞は重層化し, 実質, 内皮細胞は正常な形態を呈している。

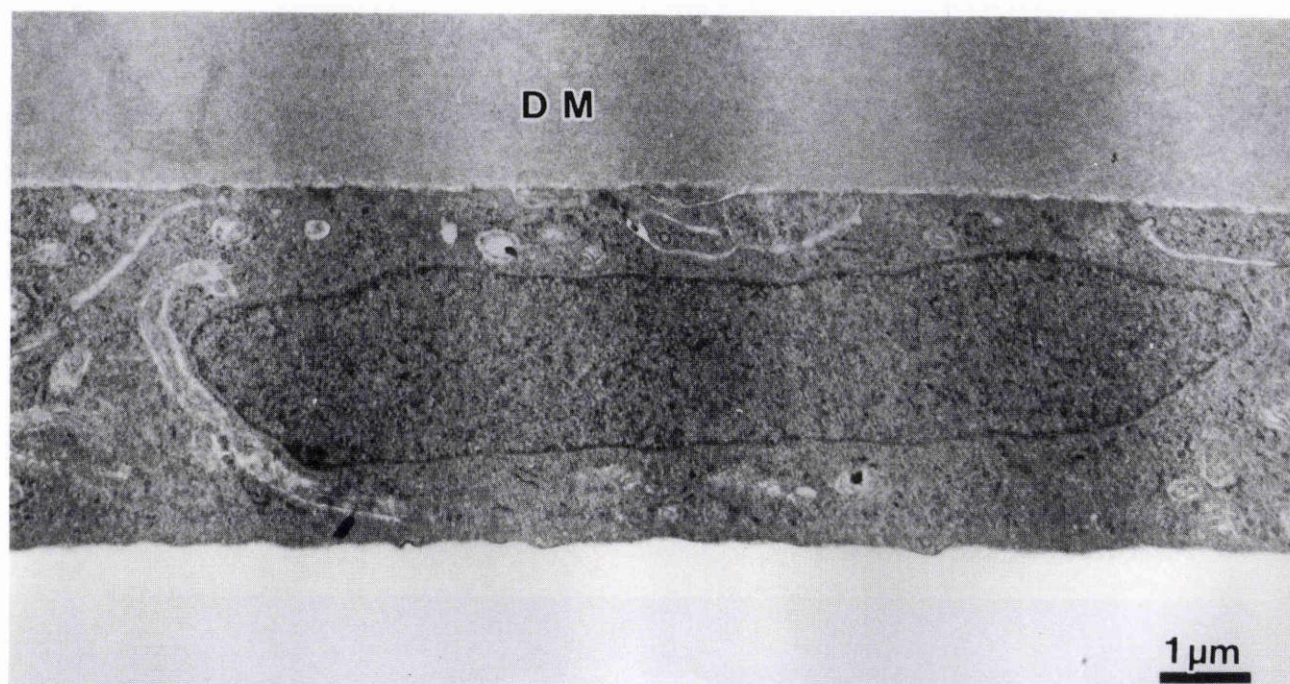


図3 照射直後の透過型電子顕微鏡所見。
内皮細胞は正常な形態を呈している。DM：デスメ膜

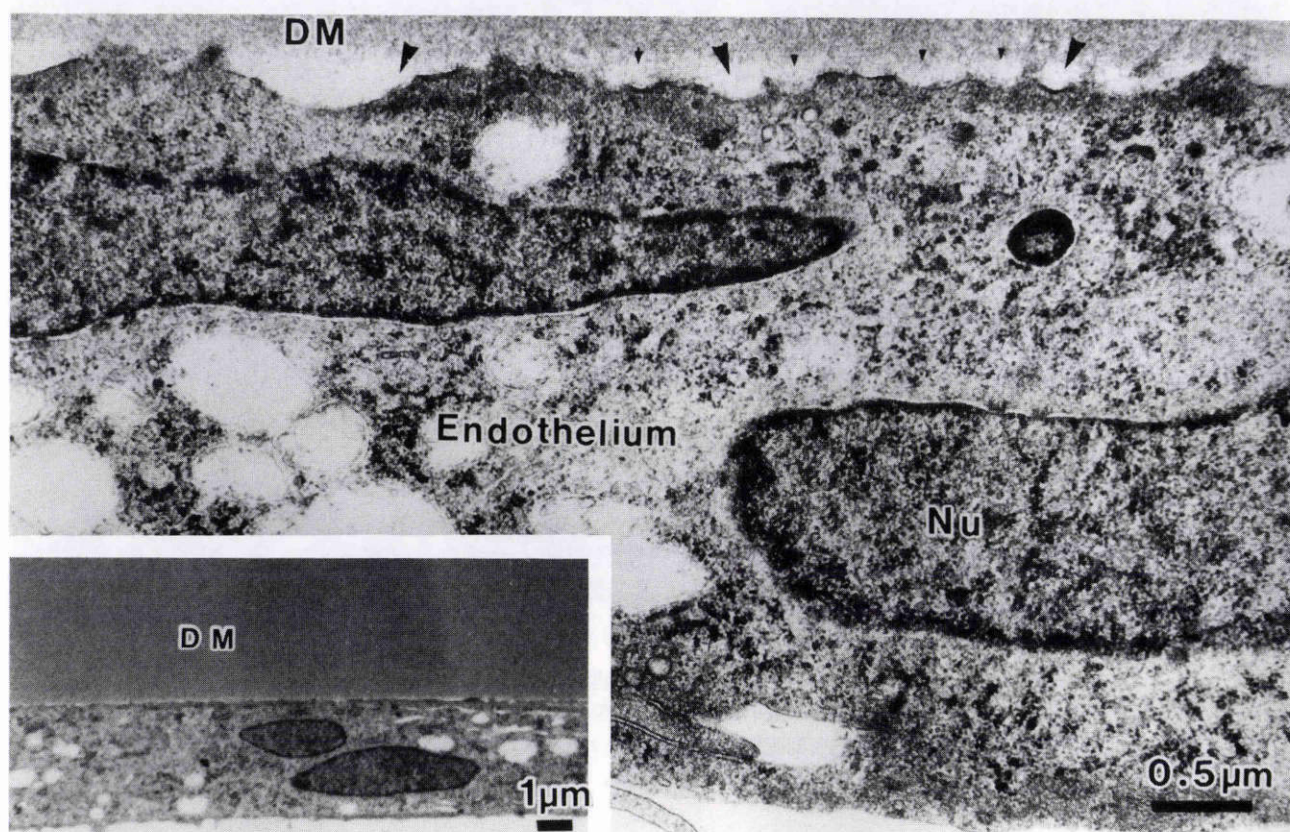


図4 照射24時間後の透過型電子顕微鏡所見。
デスメ膜－内皮細胞間に小陥凹(▼)が認められる。DM：デスメ膜，Nu：内皮細胞核

に相当する。術直後、24、48、60、72時間後において、十分な静脈麻酔で家兎を安楽死させた後、眼球摘出を行い、試料は2.5% グルタルアルデヒド液固定後、1% オスミウム液により後固定し、アルコール系列で脱水後、エポ

キシ樹脂包埋した。ミクロトーム 2088 Ultratome® V (LKB 社)を用い、光学顕微鏡用切片を作製し、トルイジンブルー染色による観察を行った。次に超薄切片を作製し、酢酸ウランおよび硝酸鉛による二重染色後、透過型電

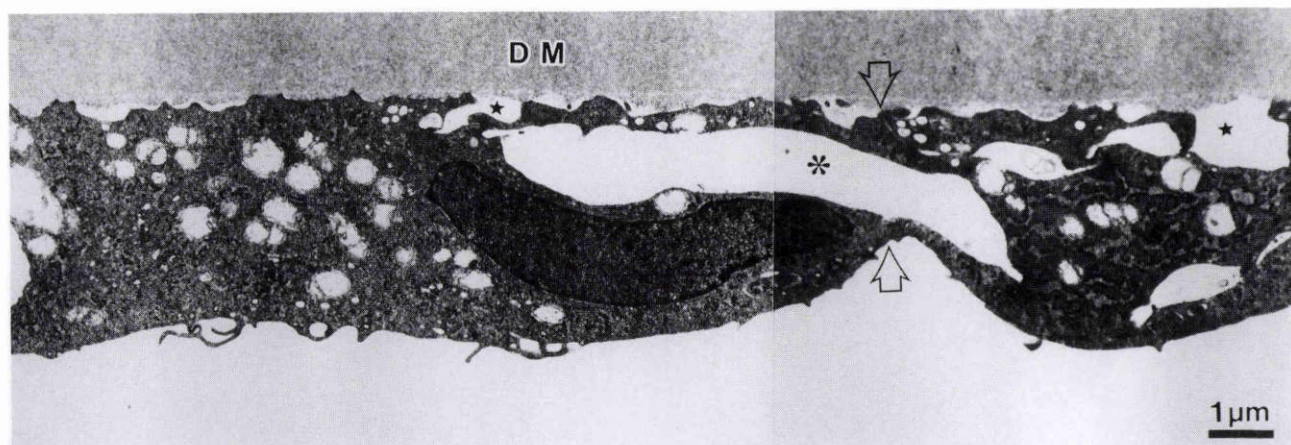


図5 照射48時間後の透過型電子顕微鏡所見。

内皮細胞は菲薄化し(X), デスメ膜側の内皮細胞膜には大小の間隙が形成され(★), 細胞相互の接合部は開大が認められる(*). DM: デスメ膜

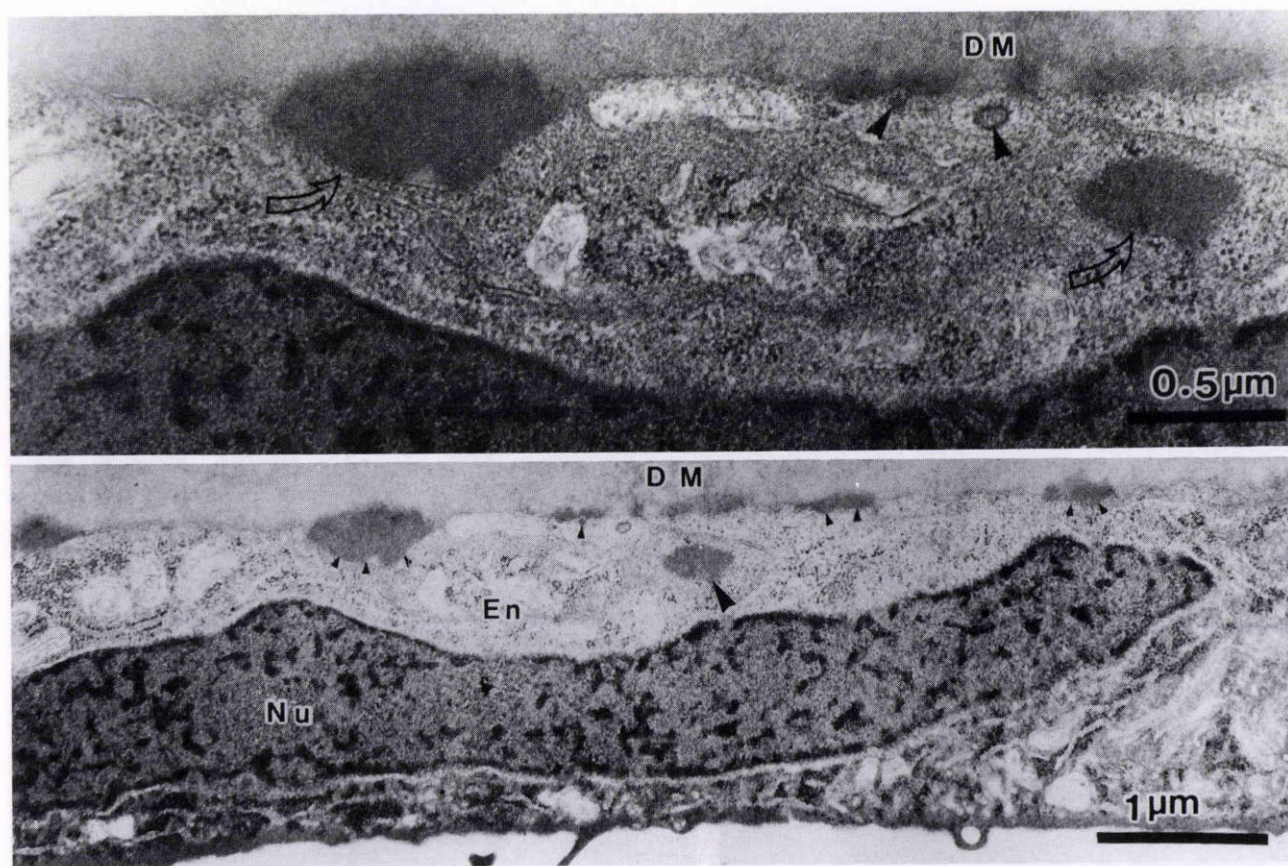


図6 照射60時間後の透過型電子顕微鏡所見。

上: 拡大図, デスメ膜側の内皮細胞膜の陥凹に接し電子密度の高い物質が認められる(↑). DM: デスメ膜.
下: 同じ電子密度を有する物質が内皮細胞質内にも認められる(▲). さらに前房側の内皮細胞の細胞質内に電子密度が高い粒子の集積が認められる. DM: デスメ膜, En: 内皮細胞, Nu: 内皮細胞核

子顕微鏡 JEM 1200 EX[®](日本電子)を用いて観察を行った。

III 結 果

1. 光学顕微鏡による観察

照射直後では照射部の実質が凹面に切除された所見が認められた。レーザー照射直下の実質層に炎症細胞の浸

潤は認められず, 内皮細胞も正常な形態を呈していた(図1 A)。24時間後では切除部実質は完全には上皮修復されていなかった。実質上層部の炎症細胞の浸潤が出現したが, 内皮細胞は正常な形態を呈していた(図1 B)。48時間後では照射部の上皮修復はほぼ完了する一方で, 実質上層部の炎症細胞浸潤が著明となった。内皮細胞には間隙が認められた(図2 A)。60時間後では実質上層部の炎症

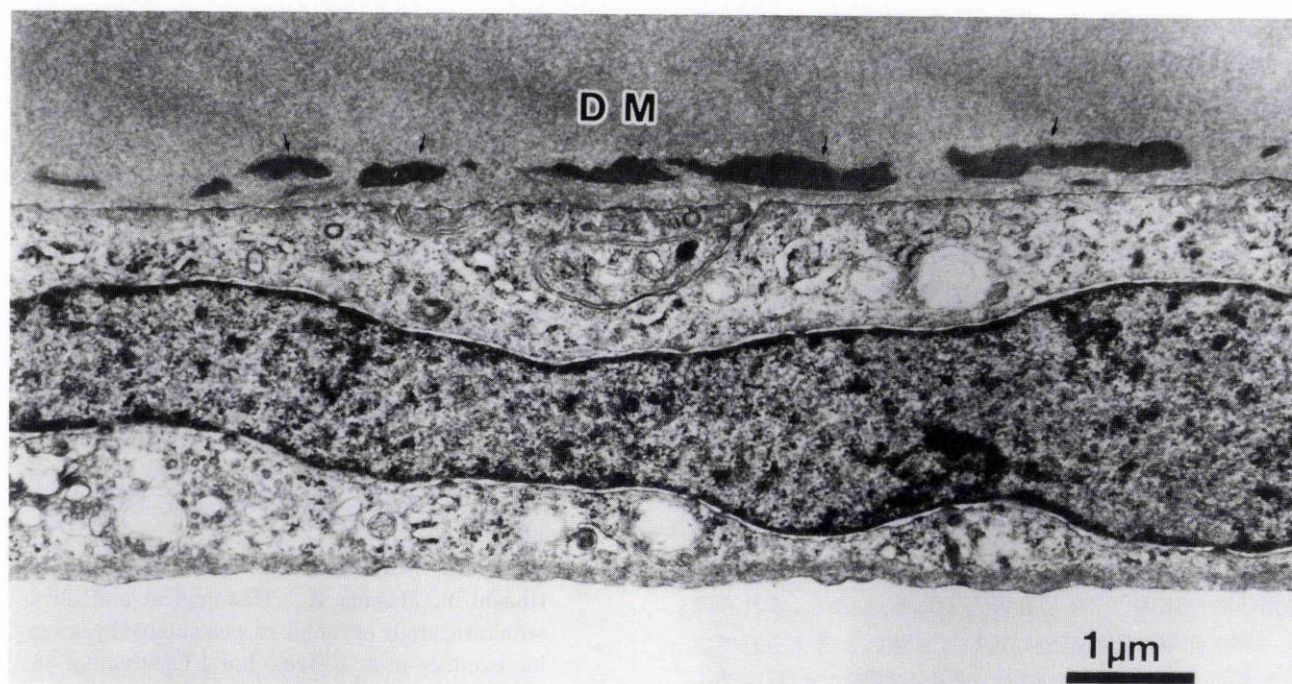


図7 照射72時間後の透過型電子顕微鏡所見.

デスメ膜上方に電子密度の高い物質が認められる. 内皮細胞間隙は縮小し, 内皮細胞小器官は正常な形態を呈している. DM: デスメ膜

細胞浸潤は軽減した. 内皮細胞の接合部は正常な状態を呈していた(図2B). 72時間後では上皮細胞が重層化する所見が認められ, 実質, 内皮細胞は正常な形態を呈していた(図2C).

2. 透過型電子顕微鏡による観察

照射直後では照射中央部の内皮細胞は正常な形態を呈していた(図3). 24時間後ではデスメ膜に接する内皮細胞膜に, 照射直後には認められなかった小さな陥凹が形成された(図4). 48時間後ではデスメ膜側の内皮細胞膜に形成された陥凹は開大し, 内皮細胞は大きく変形し, 細胞間隙は開大した(図5). この内皮細胞の変化は照射部以外の角膜周辺部にも認められた. 60時間後では内皮細胞は, 前房側とデスメ膜側で細胞質内の電子密度に差がみられた. さらに, デスメ膜側の内皮細胞膜の陥凹に接し, 電子密度の高い物質が認められた. また, 同じ電子密度を有する物質が細胞質内にも認められた(図6). 72時間後では電子密度の高い物質はデスメ膜上方に認められた. 内皮細胞の形態, 細胞間隙は正常な所見を呈していた(図7).

IV 考 按

エキシマレーザーを用いた角膜手術では, レーザーの光化学効果による分子単位での組織蒸散により, 組織侵襲を最小限に押さえ治療効果を得ることが可能といわれている^{12)~15)}. その反面, 臨床例, 動物実験例ともに照射後に上皮下混濁が必発することなど, 種々のレーザー照射による周囲組織への影響が報告¹⁶⁾¹⁷⁾されている. しかし,

PRK後の内皮細胞への影響については, ヒト角膜では特殊な例⁶⁾⁸⁾¹⁸⁾を除いては内皮細胞の減少は認められないとの報告^{4)~7)}が多いことから, 術後観察期間は短いながらもエキシマレーザーの角膜組織に対する安全性は高いことが考えられている. 一方, 家兎眼でのPRK後の組織学的検討では, レーザー照射後にデスメ膜内に高電子密度の物質が生じることが指摘されている^{9)~12)}. 今回著者らは, 本物質の発生機序について検討するため, 家兎眼に対してレーザー照射を行い, 術後早期の角膜内皮の形態学的変化を観察した. 本実験では照射60時間後にデスメ膜に接した内皮細胞膜に電子密度の高い物質が認められ, 72時間後にはこの物質はデスメ膜内に存在した. このデスメ膜内の高電子密度の物質の存在は過去の報告⁹⁾¹⁰⁾と一致した結果である. 一方, この高電子密度の物質がデスメ膜側に接した内皮細胞膜に出現する時期については, Hannaら⁹⁾は照射24時間後, 伊藤ら¹⁰⁾は照射48時間後と報告している. Hannaらは我々の使用した機種とは異なる一括照射方式のエキシマレーザー装置を使用し, 照射径, 周波数, エネルギー密度, 角膜実質切除率といった照射条件をいずれも本実験より大きく設定して実験を行っている. 伊藤らは本実験と同様の装置を使用した, phototherapeutic keratectomy (PTK) プログラムを用い, 本実験よりも切除量を大きく設定して実験を行っていた. 今回, 高電子密度の物質の出現時期が他の報告と異なった原因には, レーザー装置や照射条件の違いが関与した可能性がある. レーザー照射後の内皮細胞自体の形態については, 過去の報告^{9)~11)}では正常とされて

いる。しかし本実験では、照射 24 時間後以降にデスメ膜と内皮細胞間に変化が認められ、48 時間後には内皮細胞間隙が開大し、細胞形態に変化を認めた。デスメ膜内に生じる高電子密度の物質の発生には角膜内皮細胞に対するストレスが関与すると報告¹³⁾されており、本実験で高電子密度の物質が発生する以前に内皮細胞に変化がみられたことは、内皮細胞と高電子密度の物質との間の関連性を考えさせる。また、照射 60 時間後で高電子密度物質が内皮細胞内にみられたことも、高電子密度物質が内皮細胞由来であることを支持すると考えられる。しかし、同様の高電子密度の物質の発生は角膜上皮剥離のみ施行後の家兎眼にも認められたとの報告¹⁸⁾があり、今回の実験における本物質の発生原因が本レーザー照射に特有なものであるかについては明確ではなかった。内皮細胞形態に変化が生じた原因としては、エキシマレーザーの光化学作用¹⁴⁾や熱作用¹⁷⁾¹⁹⁾なども考えられる。しかし、これらのレーザー作用は照射部位に近いほど強いと考えられていることから、今回の内皮細胞の変化の原因には、レーザー照射時に発生すると考えられている衝撃波^{13)20)~22)}の関与が推察された。家兎眼を用いた本実験では内皮細胞の変化は可逆性であったが、ヒト角膜と家兎角膜との内皮細胞では細胞分裂能を含め大きな相違点、反応性の違い²³⁾がある。エキシマレーザー照射は角膜内皮細胞への影響を有する可能性があり、臨床例においては、エキシマレーザー照射術後早期の内皮細胞検査のみならず、長期にわたる内皮細胞の経過観察が必要であると考えられた。

文 献

- 高橋圭三, 切通 彰, 細谷比左志, 大橋裕一, 木下茂: エキシマレーザーによる屈折矯正術について. 臨眼 47: 1082-1083, 1993.
- 石川信子, 征矢耕一, 松田修実, 天野史郎, 宮田和典, 水流忠彦: Multizone 切除法によるエキシマレーザー屈折矯正術. 臨眼 49: 607-611, 1995.
- 高橋次郎, 伊東真由美, 崎元 卓, 澤 充: エキシマレーザー屈折矯正手術の術後屈折度数と上皮修復. 眼科 38: 1363-1368, 1996.
- 天野史郎, 清水公也: エキシマレーザー屈折矯正角膜切除の角膜内皮細胞への影響. 臨眼 47: 1883-1886, 1993.
- Mardelli PG, Piebenga LW, Matta CS, Hyde LL, Gira J: Corneal endothelial status 12 to 55 month after excimer laser photorefractive keratectomy. Ophthalmology 102: 544-549, 1995.
- Carones F, Brancato R, Venturi E, Morico A: The corneal endothelium after myopic excimer laser photorefractive keratectomy. Arch Ophthalmol 112: 920-924, 1994.
- Roza N, Cennamo G, DelPrete A, Pastena B, Sebastiani A: Effects on the corneal endothelium six months following photorefractive keratectomy. Ophthalmologica 209: 17-20, 1995.
- Nakaya M, Kiritoshi A, Hasegawa T, Watanabe H, Shimomura Y, Tano Y: Corneal endothelial cell loss after excimer laser keratectomy, associated with tranquilizers. Arch Ophthalmol 114: 1282-1283, 1996.
- Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO III, Savol-delli M, Cotter J, Morton K, et al: Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. Arch Ophthalmol 107: 895-901, 1989.
- 伊藤清治, 石井康雄, 新妻卓也, 林 正泰, 内海榮一郎, 普天間稔: エキシマレーザー照射後の角膜内皮細胞に及ぼす影響について. 臨眼 46: 1152-1153, 1992.
- 中安清夫, 石川 隆, 金井 淳: エキシマレーザーの眼科的应用 角膜への影響. 眼科 36: 1387-1396, 1994.
- Obata H, Takahashi K, Miyata K, Tsuru T, Ohashi Y, Masuda K: Histological and ultrastructural study of rabbit cornea ablated by scanning excimer laser system. Jpn J Ophthalmol 38: 285-291, 1994.
- Marshall J, Trokel S, Rothery S, Schubert H: An ultrastructural study of corneal incisions induced by an excimer laser at 193 nm. Ophthalmology 92: 749-758, 1985.
- Garrison BJ, Srinivasan R: Microscopic model for the ablative photodecomposition polymers by far-ultraviolet radiation (193 nm). Appl Phys Lett 44: 849-851, 1985.
- Marshall J, Trokel S, Rothery S, Krueger RR: A comparative study of corneal incisions induced by diamond and steel knives and two ultraviolet radiations from an excimer laser. Br J Ophthalmol 70: 482-501, 1986.
- Seiler T, Fantes FE, Waring GO III, Hanna KD: Laser corneal surgery. In: Waring GO III (Ed): Refractive keratotomy for myopia and astigmatism. CV Mosby, St Louis, 669-745, 1992.
- Bende T, Seiler T, Wollensak J: Side effects in excimer corneal surgery: Corneal thermal gradients. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 226: 277-280, 1988.
- Sano Y, Itoh Y, Tsuneoka H, Ohki K, Sakabe I, Kitahara K, et al: Changes in Descemet membrane and endothelium after corneal epithelial abrasion alone and with photorefractive keratectomy in rabbits. Arch Ophthalmol 114: 1105-1108, 1996.
- Marshall J, Trokel SL, Rothery S, Krueger RR: Long-term healing of the photorefractive keratectomy using an excimer laser. Ophthalmology 95: 1411-1421, 1988.
- Zabel R, Thoft S, Marshall J: Excimer laser photorefractive keratectomy: Endothelial morphology following area ablation of the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 29 (Suppl): 390, 1988.

- 21) **Krueger RR, Krasinski JS, Radzewicz C, Stonecipher KG, Varga JH, Wolf TC, et al:** High speed shadowgraphy of excimer laser excited shock wave: The effects of helium on propogation velocity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 765, 1992.
- 22) **Bor Z, Racz BHB, Szabo G, Ratkay I, Suveges I, Fust A, et al:** Plume emission, shock wave and surface formation during excimer laser ablation of the cornea. *Refract Corneal Surg* 9 (Suppl): 111—115, 1993.
- 23) **Van Horn DL, Sendel DD, Seideman S, Buco PJ:** Regenerative capacity of corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 597—613, 1977.