

角膜切開と光学的角膜切除術後の角膜実質再構築および 角膜実質細胞の反応性の比較

田中 俊朗

山口大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：角膜切開術と光学的角膜切除術後の外科的侵襲に対する角膜の生体反応を知る目的で、角膜実質細胞の反応性と実質の再構築を検討した。

方 法：ウサギあるいはラットに角膜切開術または光学的角膜切除術を施行し、経時的に組織学的変化および細胞外マトリックス成分の局在変化を検討した。

結 果：両術式とも術直後には、傷害部の実質細胞は消失してアポトーシスが誘導されていた。その後、再生上皮下に活性化実質細胞が重層化して集簇し、細胞間に無定形な物質の沈着がみられ、実質の再構築が開始されていた。術後3か月、切開術では無傷の角膜と差異がない

程度まで組織学的に修復していたが、光学的切除術では再構築された実質に細胞外マトリックス成分の強い免疫染色が観察された。

結 論：両術式とも基本的には同様な実質の創傷治癒過程を示すが、角膜切開術後の実質細胞の反応は一過性であるのに対し、光学的角膜切除術では持続することが明らかとなった。(日眼会誌 103: 337—349, 1999)

キーワード：角膜切開術, 光学的角膜切除術, 角膜実質細胞, 組織再構築, 細胞外マトリックス

Comparison of Stromal Remodeling and Keratocyte Response after Corneal Incision and Photorefractive Keratectomy

Toshiro Tanaka

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

Abstract

Purpose : We investigated the keratocyte response and stromal remodeling after corneal incision and photorefractive keratectomy, respectively to learn the difference between the two surgeries histophysiological and immunohistochemically.

Methods : We performed corneal incision or photorefractive keratectomy in rabbits or rats, and then we chronologically observed the histological changes and the changes in localization of extracellular matrix proteins.

Results : In both types of surgery, the keratocyte population in the damaged stroma became sparse, and the cells were undergoing apoptosis immediately after the procedures. After that, activated keratocytes migrated into the acellular zone, and the cells formed multiple layers at the resurfaced subepithelial regions. Deposition of amorphous substances was observed between migrated keratocytes, and

stromal remodeling began. Three months after the surgery, corneal structure had recovered to near normal condition in the corneal incisions. In photorefractive keratectomy, however, strong immunoreactivity of extracellular matrix proteins was observed in the subepithelial regions.

Conclusions : These results suggested that stromal wound healing processes were similar in both corneal incision and photorefractive keratectomy. Corneal incision may induce transient keratocyte response during the stromal remodeling, but photorefractive keratectomy may induce sustained keratocyte response. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 337—349, 1999)

Key words : Corneal incision, Photorefractive keratectomy, Keratocytes, Remodeling, Extracellular matrix

別刷請求先：755-8505 宇部市小串 1144 山口大学医学部眼科学教室 田中 俊朗

(平成 10 年 9 月 11 日受付, 平成 10 年 11 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiro Tanaka, M.D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine. 1144 Kogushi, Ube 755-8505, Japan

(Received September 11, 1998 and accepted in revised form November 25, 1998)

I 緒 言

現在,世界的に放射状角膜切開(radial keratotomy, RK)やエキシマレーザーなどを用いた屈折矯正手術が広く行われている。屈折矯正手術はこれまでの手術と異なり,良好な矯正視力を有する透明な角膜に対する手術であり,術後矯正視力を確保すると同時に良好な裸眼視力を目指すという特殊な面をもっている。

屈折矯正手術の歴史は1972年のRKに始まり¹⁾,術後角膜の脆弱性や精度の問題を改善するために,1990年代に入りエキシマレーザーによるphotorefractive keratectomy (PRK)が開発されてきた^{2)~4)}。その後さらに,矯正力の拡大や術後hazeの問題の解決のために,automated lamellar keratoplasty (ALK)とエキシマレーザーを組み合わせたlaser-assisted *in situ* keratomileusis (LASIK)へと変遷してきている^{5)~7)}。屈折矯正手術の外科的技術は極めて進歩しているが,外科的侵襲に対する角膜の反応性について術式による差異の理解は未だ十分ではない。

屈折矯正手術は,切開により角膜の張力を変化させる術式(RKやastigmatic keratotomy, AK)と形状をトリムする術式(PRK, LASIK)に大きく分類される。AKやRKなどの切開による屈折矯正手術はノモグラムの発展により比較的許容される術後成績を得ることができるが,年齢による効果の差やPERK Study Groupで明らかとなった術後長期間にわたる遠視化など,未だ解明されていない問題点もある⁸⁾⁹⁾。一方,PRKはより精度良く手技も簡単に近視を矯正することができるが,角膜の中心部を照射するためhazeと呼ばれる上皮下混濁や近視側への戻りなどの問題点を有している⁸⁾¹⁰⁾。これらの各術式における問題点は,外科的侵襲に対する角膜の生体反応や創傷治癒過程によると考えられる。したがって,外科的侵襲に対する角膜の反応性,すなわち角膜創傷治癒過程を理解することは術後の安全性や有効性を知るためにも重要なことである。

今回,屈折矯正手術に用いられている基本的手技である角膜への切開と光学的切除に対して角膜がいかに対応するか,特に実質再構築および角膜実質細胞の反応性に焦点を当て,形態学および免疫組織学的に比較検討した。

II 方 法

1. 実験動物および角膜切開術と光学的角膜切除術の方法

組織学的(光学顕微鏡および電子顕微鏡)検討およびアポトーシスの検出には日本白色家兎(雄,1.5 kg,30匹,KBTオリエンタル)を用いた。白色家兎を塩酸ケタミン(ケタラル[®] 50,三共)およびキシラジン塩酸塩(セラクター[®] 2%注射液,バイエル)による全身麻酔および4%リドカイン点眼麻酔した後,ダイヤモンドナイフ(Ka-

tena社製)による角膜切開(角膜中央部,深度は250 μm,6 mm直線切開)あるいは光学的角膜切除(角膜中央部を6 mmの直径で機械的に上皮剥離,エキシマレーザー照射)を行った。用いたエキシマレーザーはNIDEK社製のEC-5000であった。照射条件はPRK modeで,周波数30 Hz,78 scan行い,これはヒト角膜で3 diopterの近視矯正に相当する照射条件である。

免疫組織学的検討にはラット(Wistar系,雄,250 g,16匹,セアック吉富)を用い,角膜中央部にダイヤモンドナイフ(Katena社製)を用いて150 μmの深度で3 mmの直線切開を行った。また,角膜上皮を直径3 mmの大きさに機械的剥離した後,エキシマレーザーを照射した(PRK mode,周波数30 Hz,83 scan,ヒト角膜で50 μmの深度に相当)。

各処置後経時的に実験動物を過量のペントバルビタールナトリウム(ネプタール[®],大日本製薬)耳静脈注射により安楽死させ,組織学的検討あるいは免疫組織学的検討に用いた。

本研究は,山口大学医学部動物実験委員会の審査を受け,「山口大学医学部動物実験指針」,「動物の保護及び保管に関する法律」(法律第105号)および「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(総理府告示第6号)の規制に基づいて行われた。

2. 組織学的検討

日本白色家兎に角膜切開あるいはエキシマレーザー照射を行い,処置後3,6時間,1日,1,2週,1,3か月に安楽死させた後,直ちに大動脈から2%グルタルアルデヒドによる灌流固定および点眼による固定を行った。眼球を摘出した後,2%グルタルアルデヒドによる固定と2%四塩化オスミウムによる二重固定を行った。アセトン系列による脱水後,エポキシ樹脂による包埋を行い,薄切片を作製してトルイジンブルーで染色した後,光学顕微鏡(Axioskop 50, Zeiss, ドイツ)により観察した。さらに,超薄切片を作製し,2%酢酸ウラン-クエン酸鉛による電子染色を行い,電子顕微鏡(JOEL-200 X, 日本電子)を用いて微細構造を観察した。

3. アポトーシスの検出

日本白色家兎に角膜切開あるいはエキシマレーザー照射を行い,処置1時間後に眼球を摘出してOCT compound (Miles, Elkhart, 米国)中に包埋し,ドライアイス・アセトン中で凍結してMicrotome cryostat (HM 505 N, Zeiss, ドイツ)を用いて厚さ6 μmの凍結切片を作製した。Apoptosis Detection System (Promega, Madison, 米国)を用いてTdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL)染色後,リン酸緩衝生理食塩水(PBS):無蛍光グリセリン(1:2)の混合液で封入し,蛍光顕微鏡(Axioskop 50, Zeiss, ドイツ)を用いて暗視野で観察し,フジクローム ISO 400で写真撮影した。

4. 免疫組織学的検討

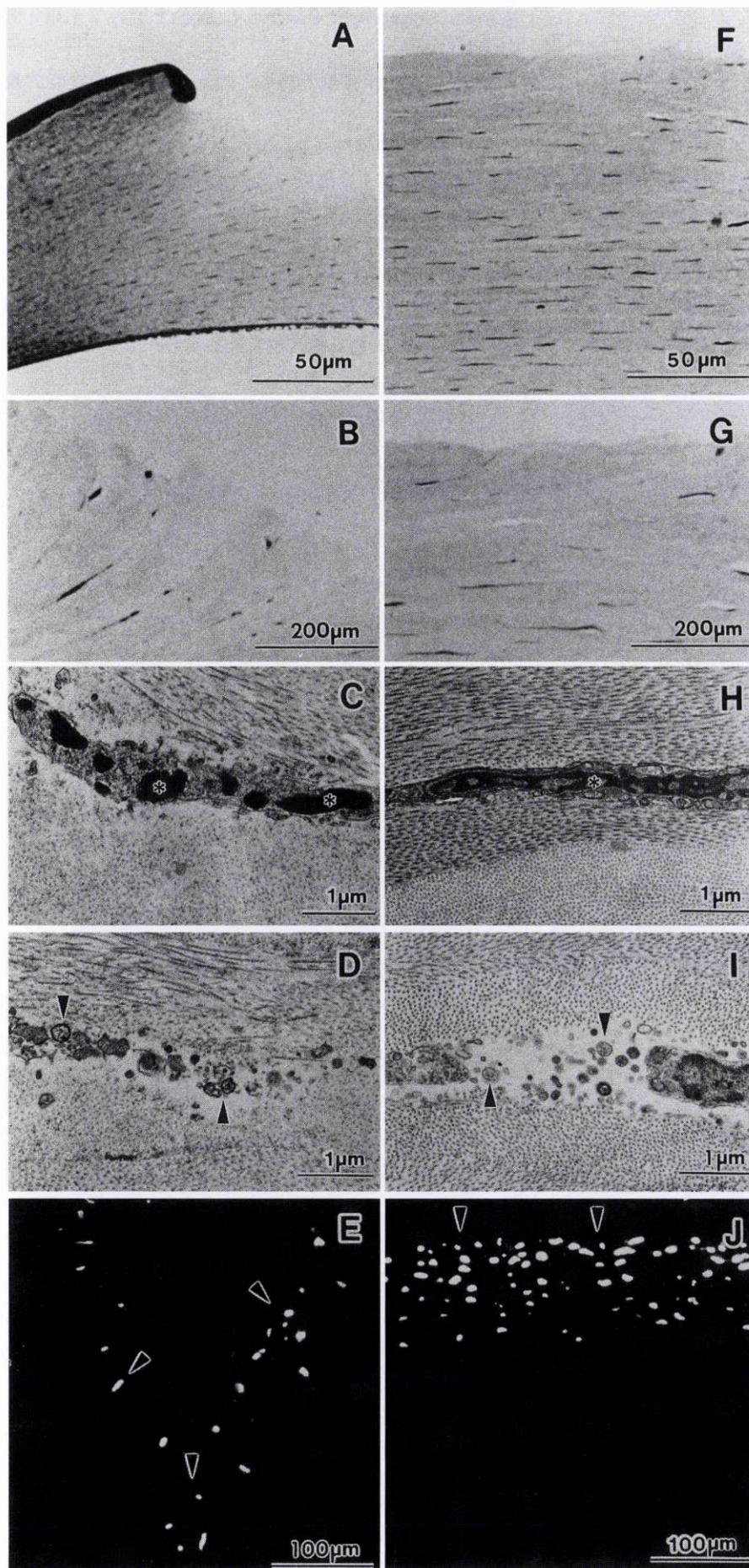


図1 角膜切開,エキシマレーザー照射直後の組織変化.

角膜切開(A~E)およびエキシマレーザー照射(F~J)直後において,角膜切開では切開創がV字型に開き(A),エキシマレーザー照射では,実質が露出されていた(F),いずれの術式においても傷害部断面の角膜実質細胞は変性しており(B,G),変性した細胞は濃縮した核クロマチン(*,C,H),アポトーシス小体(矢じり,D,I)の形成がみられ,傷害部断面にTUNEL陽性細胞(矢じり)があった(E,J).

細胞外マトリックスであるラミニン, VI 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの局在変化を免疫組織学的に検討した。

1) 抗体

一次抗体として, ウサギ血清抗ヒトフィブロネクチン抗体 (LSL), ウサギ血清抗マウスラミニン抗体 (LSL) あるいはウサギ血清抗マウス IV 型コラーゲン抗体 (LSL) を, 陰性対照として正常ウサギ血清 (Cappel, Aurora, 米国) を, 二次抗体としてフルオレセイン・イソチオシアネイト標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel) を用いた。それぞれ 1% のウシ血清アルブミン Fraction-V (BSA, Inter-

gen, Purchase, 米国) を添加した PBS を用いて 1,000 倍に希釈した。

2) ラット角膜組織の細胞外マトリックスの経時的観察

ラットに角膜切開あるいはエキシマレーザー照射を行い, 処置後 1 日, 1, 2 週, 1, 3 か月に眼球を摘出して OCT compound (Miles, Elkhart, 米国) 中に包埋してドライアイス・アセトン中で凍結し, Microtome cryostat (HM 505 N, Zeiss, ドイツ) を用いて厚さ 6 μm の凍結切片を作製した。PBS で洗浄後, 切片を 1% BSA 添加 PBS と 1 時間 (室温) 反応させて非特異的反応を防止した。一次抗体

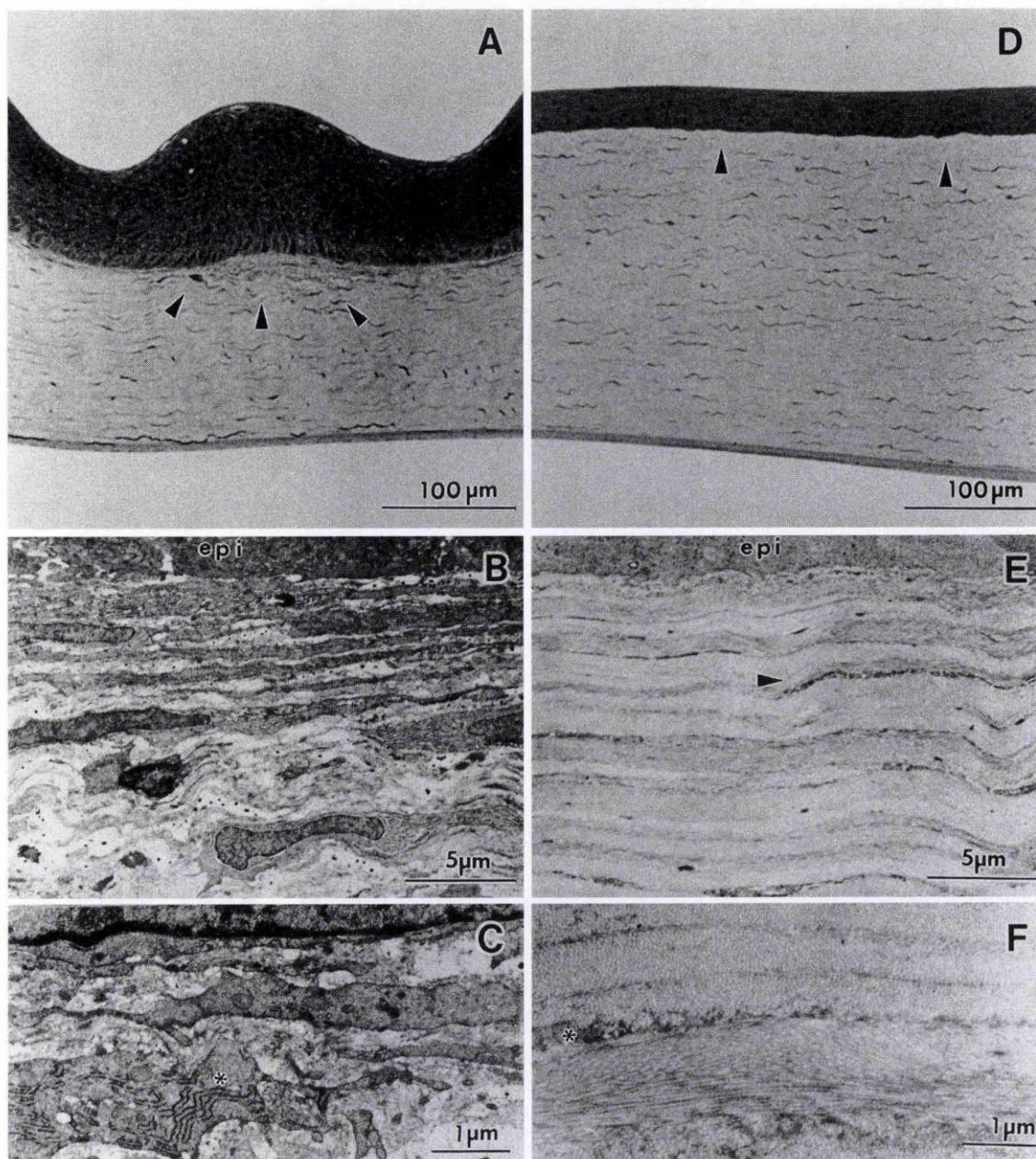


図 2 角膜切開, エキシマレーザー照射 1 週間後の組織変化。

A: 角膜切開 1 週間後では, 過形成した上皮と上皮下に多数の角膜実質細胞 (矢じり) があつた。B, C: 角膜実質細胞は上皮 (epi) 直下に層状に集簇しており, 活性化した角膜実質細胞 (*) があつた。D: エキシマレーザー照射 1 週間後では, 照射部に角膜実質細胞 (矢じり) が侵入し始めていた。E, F: 電子顕微鏡 (電顕) による観察では上皮 (epi) 下に細胞成分がみられず, アポトーシス小体の残骸 (矢じり, *) があつた。

あるいは陰性対照用の血清と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PBS：無蛍光グリセリン(1:2)の混合液で封入し、蛍光顕微鏡(Axioskop 50, Zeiss, ドイツ)を用いて暗視野で観察し、フジクローム ISO 400 で写真撮影した。

III 結 果

1. 形態学的観察

1) 術後早期(直後から 6 時間)の変化

角膜切開後早期の光学顕微鏡(光顕)による観察では、切開創は V 字型に開き(図 1 A), 切開断面近傍の角膜実質には断裂したり不均一に染色される変性した実質細胞があった(図 1 B)。電子顕微鏡(電顕)で観察すると、濃縮した核クロマチン(図 1 C)および膜に包まれて細かく分解したアポトーシス小体の形成があった(図 1 D)。また、角膜組織の TUNEL 染色を行うと、正常角膜では TUNEL 陽性細胞はほとんどなかったが、切開を加えた角膜では切開断面近傍に TUNEL 陽性細胞が多数あった(図 1 E)。

エキシマレーザー照射後早期の光顕観察では、実質表層は露出し(図 1 F), 切除された実質表層の細胞は変性していた(図 1 G)。電顕で観察すると、変性した角膜実質細胞には核クロマチンの濃縮(図 1 H)やアポトーシス小体があった(図 1 I)。TUNEL 染色を行うと、エキシマレーザー照射部位に一致して、TUNEL 陽性細胞が多数あった(図 1 J)。

これらの所見から、角膜切開あるいはエキシマレーザー照射のいずれの術式においても、術後早期には傷害部近傍の角膜実質細胞はアポトーシスにより細胞死に陥り、無細胞領域が形成されることが明らかになった。

2) 1 週間後の変化

角膜切開 1 週間後、切開部は上皮細胞で再被覆され、過形成した上皮下に紡錘形をした角膜実質細胞が多数あった(図 2 A)。電顕による観察でも、紡錘形をした角膜実質細胞は上皮直下に層状に集簇しており(図 2 B)、これらの細胞間にはコラーゲン線維がほとんど観察されず、再被覆した上皮細胞層の下に遊走してきたと考えられた。さらに、これらの細胞は多数の粗面小胞体を有しており、活性化した角膜実質細胞であると考えられた(図 2 C)。

エキシマレーザー照射 1 週間後、照射部は角膜上皮細胞で完全に再被覆されていた。術後早期に観察された無細胞領域の照射周辺部では太い突起をもった角膜実質細胞が多数あり、レーザー照射により周辺部から活性化した角膜実質細胞が無細胞領域に侵入してくることが推測された(図 2 D)。しかし、照射中央部の上皮下には細胞成分はみられず(図 2 E)、一部散在せずにアポトーシス小体が紡錘形に残存していた(図 2 F)。

これらの所見から、術 1 週間後の角膜切開は早期の炎

症期を過ぎて、上皮細胞が増殖して過形成を来し、上皮下では活性化した角膜実質細胞が集簇して新たなマトリックスの合成を開始する時期で、創傷治療過程の細胞活性期であると考えられた。一方、エキシマレーザー照射では上皮の再被覆は完了していたが、実質の無細胞領域は残存し、周囲から活性化角膜実質細胞が侵入し始め、炎症期から細胞活性期へ移行する時期であると考えられた。

3) 2 週間後の変化

角膜切開 2 週間後、切開部の上皮の厚みは薄くなり始め、上皮細胞の分化が進行していると考えられた。また、切開 1 週後と同様に切開部の上皮下には多数の角膜実質細胞が観察された(図 3 A)。電顕による観察では、上皮下の角膜実質細胞は互いに距離をおいて層状に集簇していた(図 3 B)。実質細胞間のスペースには無定形な細胞外マトリックスがみられた(図 3 C)。

エキシマレーザー照射 2 週間後、照射部の再被覆した上皮は重層構造を示し、分化が進行していると考えられた。上皮下に多数の角膜実質細胞が観察された(図 3 D)。電顕による観察では、上皮下の角膜実質細胞は残存した実質表層のコラーゲン線維と上皮との間にわずかな距離をもって層状に集簇しており(図 3 E)、角膜実質細胞間には無定形な細胞外マトリックスがみられた(図 3 F)。

このように、1~2 週にかけて角膜切開では上皮下に集簇してきた角膜実質細胞により細胞外マトリックス成分の合成が行われて細胞間に無定形の蓄積がみられ、創傷治療過程の再構築期であると考えられた。一方、エキシマレーザー照射では徐々に活性化した角膜実質細胞が遊走してくるとともにマトリックスの合成が開始し、細胞活性期から再構築期に移行する時期であると考えられた。

4) 3 か月後の変化

角膜切開後 3 か月では、上皮の厚みはさらに薄くなるものの正常角膜上皮に比して、未だ過形成を呈していた。上皮下実質中の角膜実質細胞間の距離はさらに開き、ほぼ正常角膜で見られるような細胞間隔になっていた(図 4 A)。電顕的に、上皮基底膜構造がみられるものの未だ不整で、上皮直下の実質部にはコラーゲン線維をほとんど含まず、無定形な物質が存在していた(図 4 B, C)。さらに、実質深層部の角膜実質細胞周辺では比較的整然としたコラーゲン線維があったが、コラーゲン線維間には電子密度の高い無定形な構造が散在していた(図 4 D)。

エキシマレーザー照射後 3 か月では、上皮の重層構造はほぼ正常化し、実質中の角膜実質細胞間の距離も正常化してきた(図 4 E)。電顕的には、上皮下に比較的平滑な基底膜構造が観察された。上皮直下の再構築された実質浅層部では、比較的整然としたコラーゲン線維間に電子密度の高い物質が存在していた(図 4 F~H)。

このように角膜切開 3 か月には、形態学的にかなり正常な角膜構造に修復してきていると考えられたが、上皮細胞層と実質との境界はまだ平滑ではなかった。一方、エ

キシマレーザー照射では上皮下の実質に比較的整然としたコラーゲン線維があり,組織の再構築がかなり進行していると考えられた。

2. 免疫組織学的検討

1) フィブロネクチン

正常ラット角膜において,フィブロネクチンは上皮基底膜,実質細胞および実質のコラーゲン線維に沿って存在し,さらにデスメ膜にもみられた(図5A)。

切開早期(1日後),切開断面にフィブロネクチンの強い蛍光が観察された(図6A).エキシマレーザー照射1

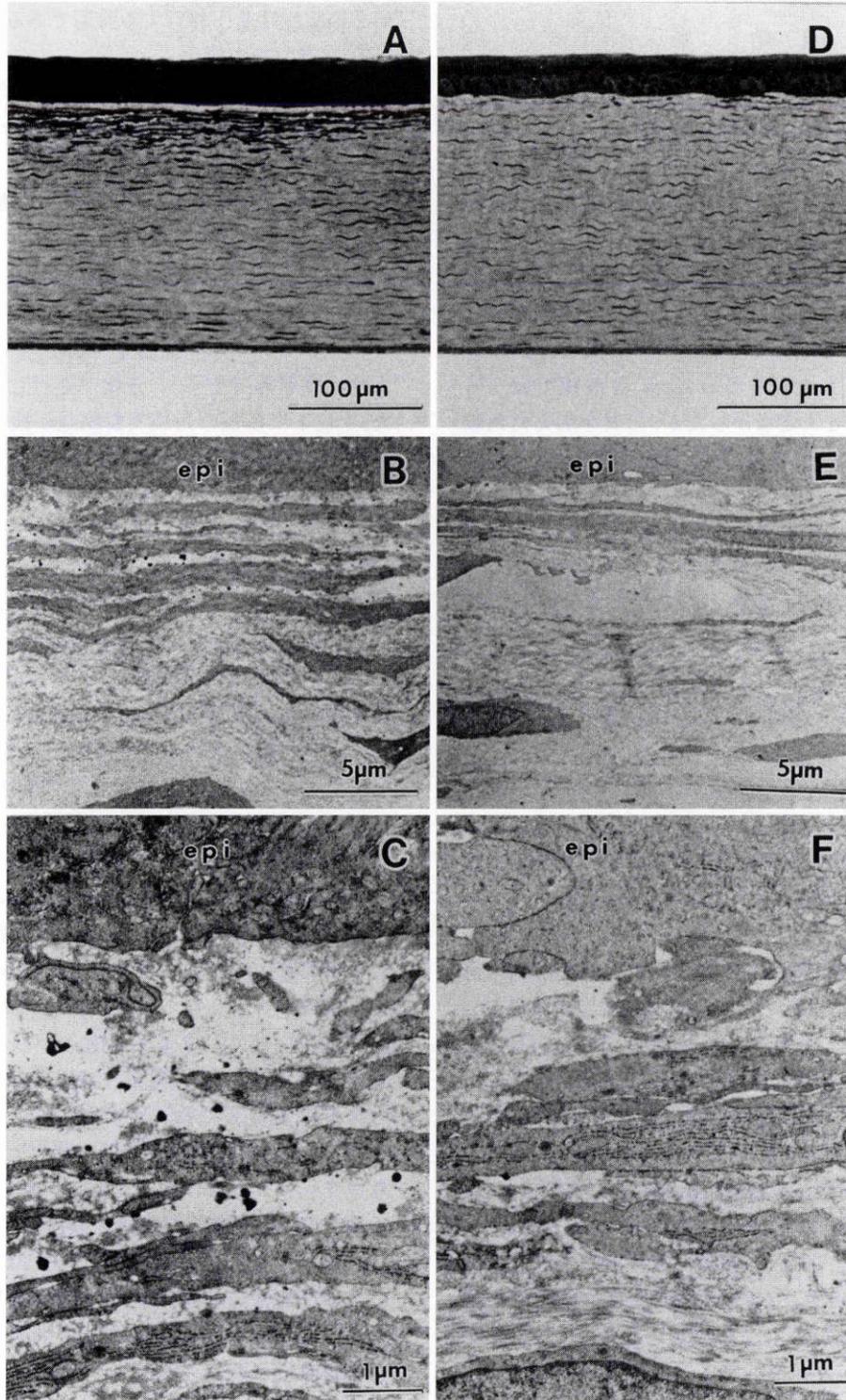


図3 角膜切開,エキシマレーザー照射2週間後の組織変化.

角膜切開2週間後では,上皮下に多数の角膜実質細胞が観察された(A).実質細胞は互いに距離をおいて上皮(epi)下に層状に集簇し(B),細胞間に無定形な細胞外マトリックスがあった(C).エキシマレーザー照射2週間後,上皮下に角膜実質細胞の集簇があった(D).集簇した角膜実質細胞は,上皮(epi)の直下に位置し(E),細胞間に無定形な細胞外マトリックスがあった(F).

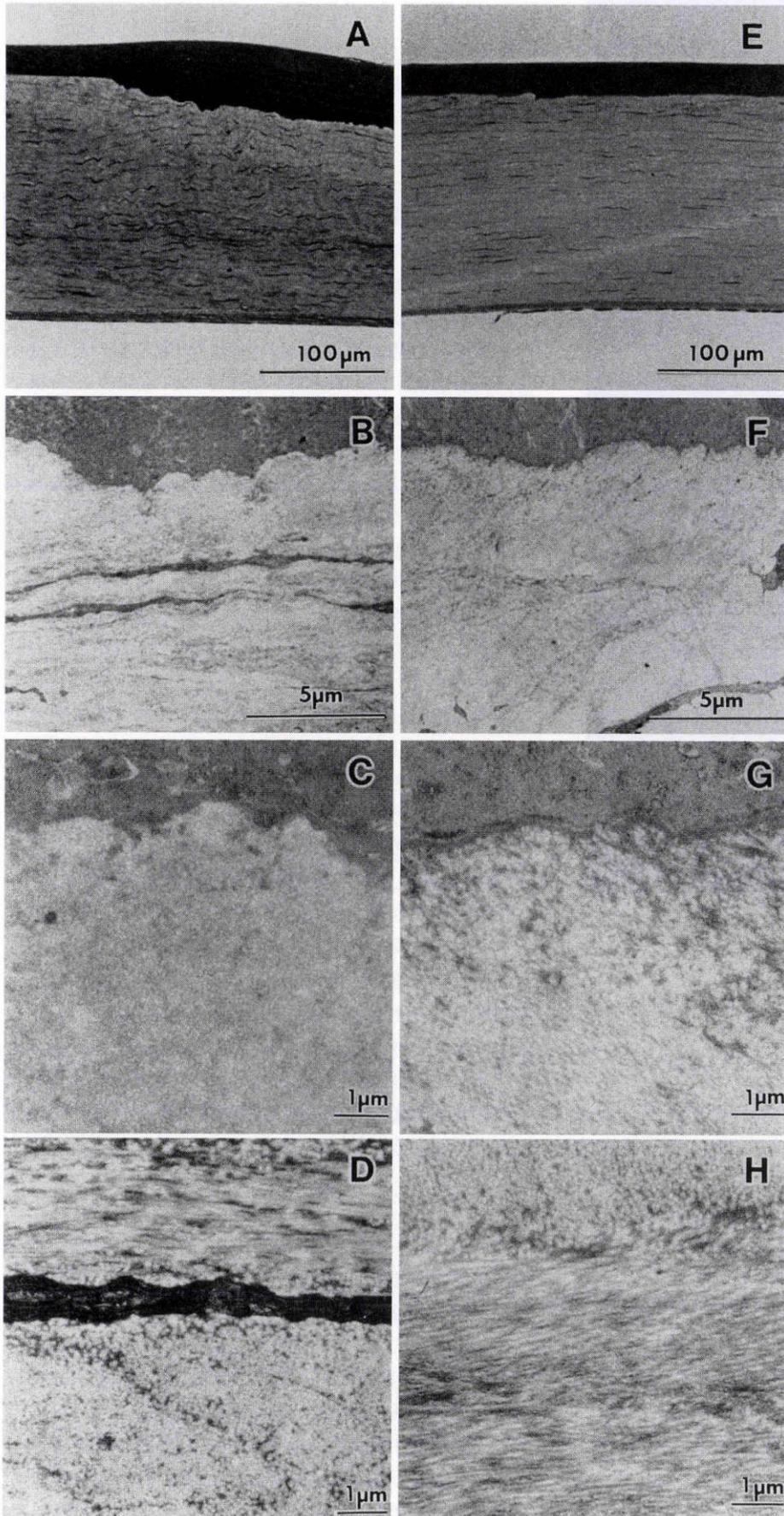


図 4 角膜切開,エキシマレーザー照射 3 か月後の組織変化.

角膜切開 3 か月後,上皮は未だ過形成を呈していたが,実質細胞の密度はほぼ正常化していた(A).再構築された部位に無定形なマトリックスがあったが(B, C),実質深層では層状にコラーゲン線維の走行があった(D).エキシマレーザー照射 3 か月後,上皮はほぼ正常化し,実質細胞の密度もほぼ正常化していた(E).再構築された実質は無定形な細胞外マトリックスであったが(F, G),コラーゲン線維を含んでいた(H).

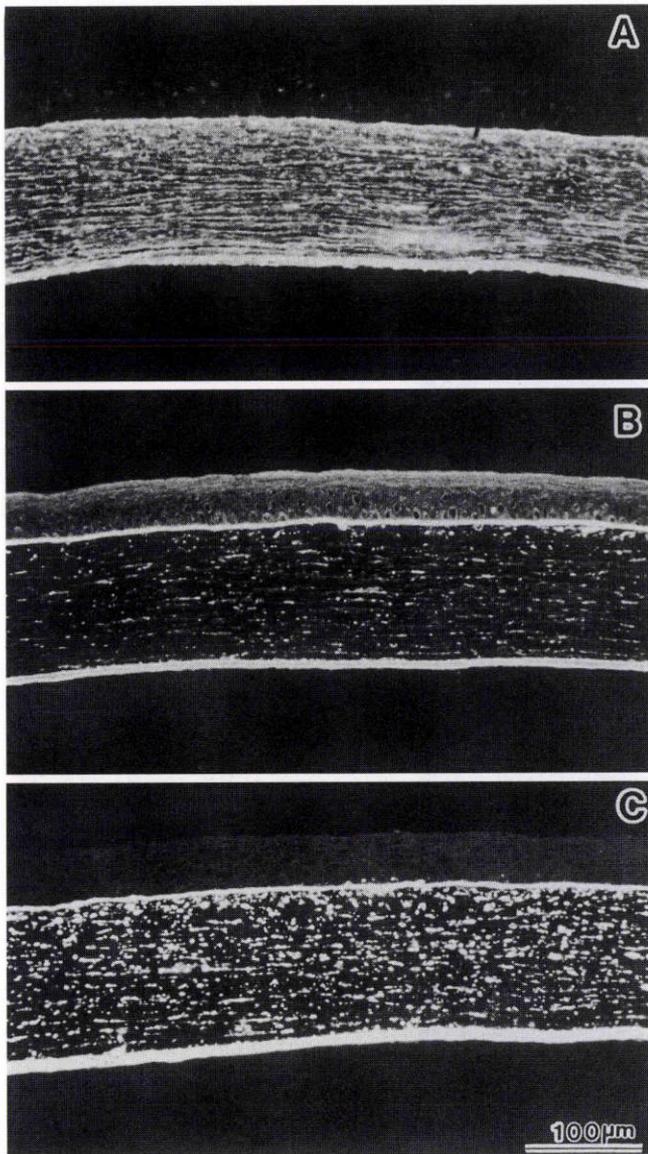


図5 正常ラット角膜における細胞外マトリックス成分の局在。

フィブロネクチンは上皮基底膜、実質中およびデスメ膜にあった(A)。ラミニンは上皮基底膜とデスメ膜にあった(B)。IV型コラーゲンも上皮基底膜とデスメ膜にあり、実質にも点状にみられた(C)。

日後のフィブロネクチンも照射部の実質浅層に強い蛍光が観察された(図6C)。したがって、術1日後はいずれの術式においても傷害部の実質表層に上皮細胞が欠損部を再被覆するための一時的な基底膜としてフィブロネクチンが傷害部に発現してくることが明らかとなった。

角膜切開3か月後では、フィブロネクチンは正常角膜でみられるのとはほぼ同様な局在であったが、切開創上皮下ではわずかに強い蛍光があった(図6B)。しかし、エキシマレーザー照射3か月後でもフィブロネクチンは上皮下に強い蛍光として観察され(図6D)、再構築された部位で角膜実質細胞が活発にフィブロネクチンを合成していることが推定された。

2) ラミニン

正常ラット角膜では、ラミニンに対する蛍光は上皮基底膜とデスメ膜にみられ、実質中にも薄く線上にみられた(図5B)。

切開1日後には、ラミニンに対する蛍光は上皮細胞が再被覆した上皮と実質の境界部にわずかに発現していたが、切開断面にはラミニンに対する蛍光はなかった(図7A)。エキシマレーザー照射1日後には照射部にラミニンに対する蛍光はなかった(図7C)。したがって、術1日後はいずれの術式においても傷害部の上皮基底膜部のラミニンは消失しており、基底膜が切断・切除されていることが明らかとなった。

角膜切開3か月後では、ラミニンに対する蛍光はいったん増加した切開創上皮下の実質中の蛍光もかなり減弱し、切開創周囲はほぼ正常角膜でみられる局在と同様であった(図7B)。しかし、エキシマレーザー照射3か月後では、フィブロネクチンの局在と同様にラミニンも上皮下に強い蛍光として観察され(図7D)、移動した角膜上皮細胞および再構築された実質の角膜実質細胞により活発にラミニンが合成されていることが推定された。

3) IV型コラーゲン

正常ラット角膜のIV型コラーゲンに対する蛍光は、上皮基底膜とデスメ膜にみられた以外に実質中にも点状にみられた(図5C)。

切開1日後、IV型コラーゲンに対する蛍光は切開断面には全くなかった(図8A)。エキシマレーザー照射1日後も照射部にIV型コラーゲンに対する蛍光はなかった(図8C)。したがって、術1日後はいずれの術式においても傷害部の上皮基底膜部のIV型コラーゲンはラミニンと同様に消失し、基底膜が切断・切除されていた。

角膜切開3か月後では、IV型コラーゲンに対する蛍光はラミニンの局在と同様、いったん増加した切開創上皮下の実質中の蛍光もかなり減弱し、切開創周囲はほぼ正常角膜でみられる局在と同様であった(図8B)。しかし、エキシマレーザー照射3か月後では、IV型コラーゲンも上皮下に強い蛍光として観察され(図8D)、再構築された角膜実質細胞により活発にIV型コラーゲンも合成されていることが推定された。

IV 考 按

今回、術式の異なった角膜切開術と光学的角膜切除術後の角膜実質細胞の反応性を形態学的に、また、再構築された実質の細胞外マトリックスの局在を変化を免疫組織学的に比較検討した。その結果、術式により角膜の創傷治癒過程の質には差はなかったが、外科的侵襲に対する角膜の反応時期あるいは程度は明らかに異なっていた。すなわち、角膜切開術は比較的速やかに傷害部は修復されるが、光学的角膜切除術では実質細胞の活性化が持続し、マトリックスの蓄積が長期にわたりみられることが明らか

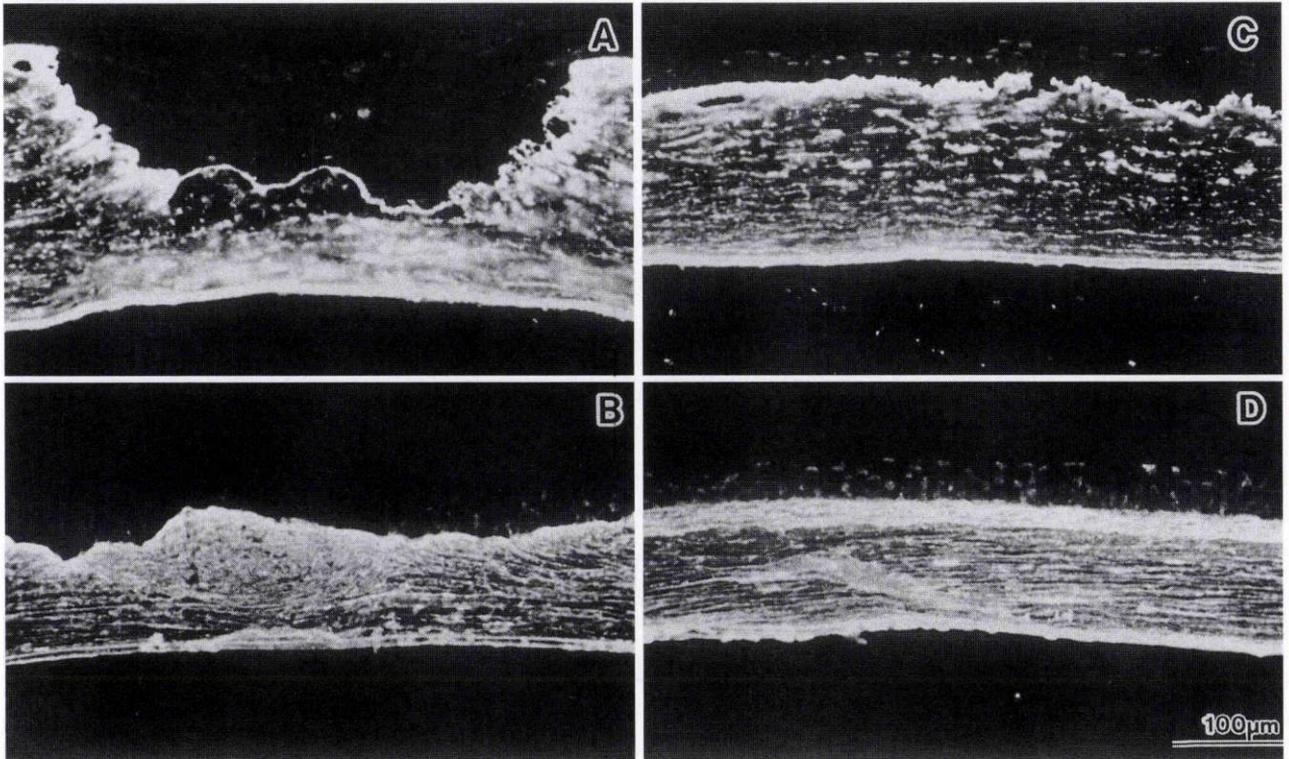


図 6 角膜切開,エキシマレーザー照射後のフィブロネクチンの局在変化.

切開 1 日後,切開断面に強い蛍光が観察された(A).照射 1 日後も照射部の実質浅層に強い蛍光が観察された(C).角膜切開 3 か月後には上皮下にわずかに強い蛍光が観察された(B).照射 3 か月後,上皮下に強い蛍光が観察された(D).

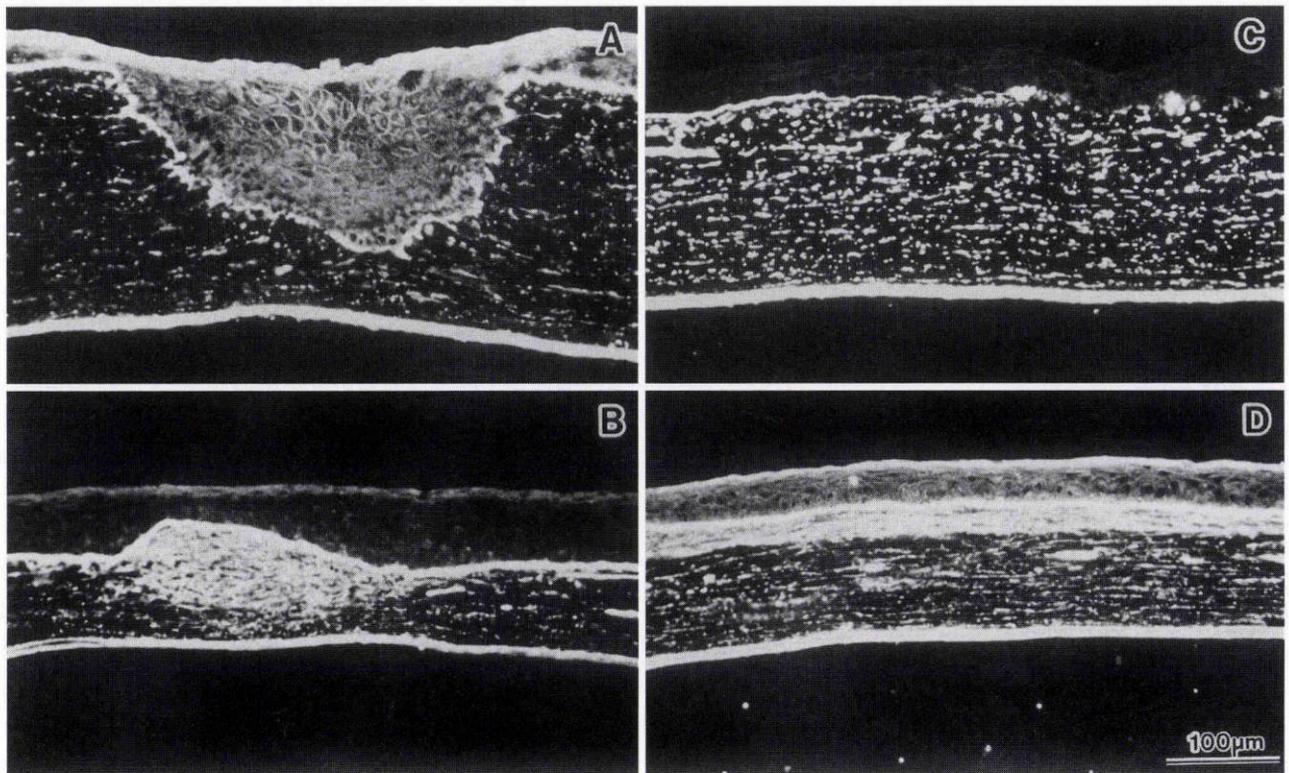


図 7 角膜切開,エキシマレーザー照射後のラミニンの局在変化.

切開 1 日後,切開断面に蛍光はなかった(A).照射 1 日後も照射部に蛍光はなかった(C).角膜切開 3 か月後には上皮下にわずかに蛍光が観察された(B).照射 3 か月後,上皮下に強い蛍光が観察された(D).

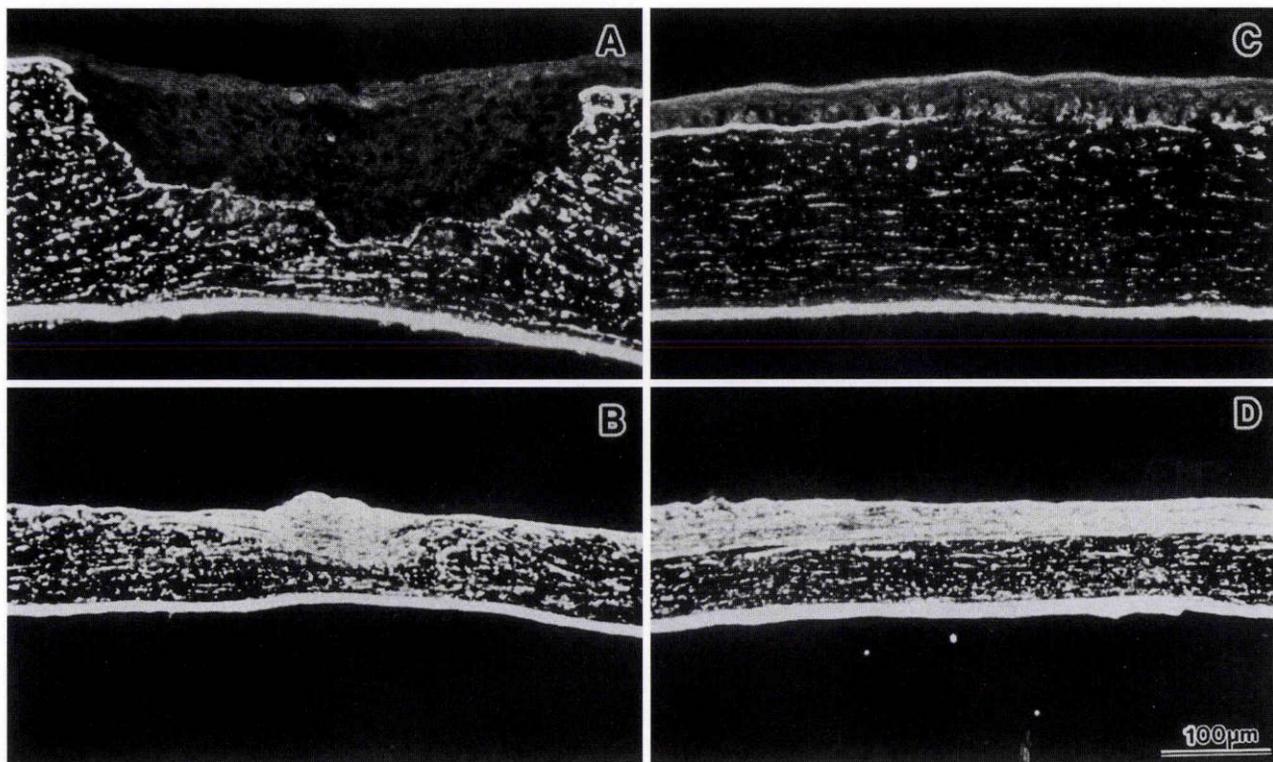


図8 角膜切開,エキシマレーザー照射後のIV型コラーゲンの局在変化.

切開1日後,切開断面には全くなかった(A).照射1日後も照射部にはみられなかった(C).角膜切開3か月後には上皮下にわずかに蛍光が観察された(B).照射3か月後,上皮下に強い蛍光が観察された(D).

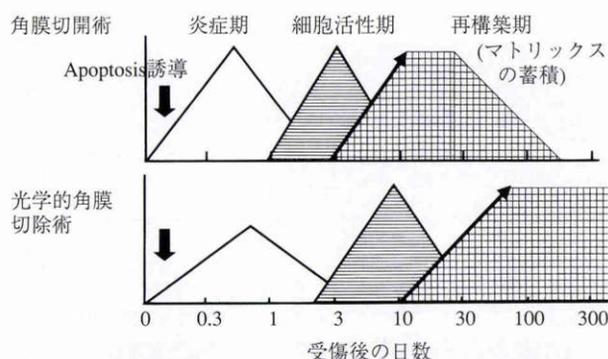


図9 角膜切開術と光学的角膜切除術後の経時的な角膜実質の創傷治癒過程.

となった.

今回得られた2種類の外科的侵襲に対する角膜の形態学的変化および細胞外マトリックス成分の局在変化は,既に報告されている角膜切開術あるいは光学的角膜切除術後の個々の結果と非常に良く一致していた^{11)~23)}.従来までは個々の外科的侵襲に対する経時的な角膜創傷治癒変化しか観察されておらず,術式の違いによる角膜の反応性の差異についての比較は明らかにされていなかった.今回,角膜切開術と光学的角膜切除術の2種類の外科的侵襲に対する角膜の反応性を同時に比較することにより,同じような目的で用いられている屈折矯正手術でも,異なった術式では角膜に対する反応性は大きく異なって

いることが明らかとなった.したがって,種々の屈折矯正手術が報告されているが,各術式による角膜の反応性の差異を理解することは術後の有効性や安全性を知る上でも非常に重要なことである.

一般に創傷治癒の研究は皮膚を用いて良く研究されている²⁴⁾²⁵⁾.皮膚での創傷治癒は生体が傷害を受けた場合には,まず,血管収縮による止血,血小板による血液凝固反応による血液凝固期がある.次に,多核白血球を中心とする炎症細胞の浸潤が起こり,感染防御ならびに創傷治癒の開始を促す炎症期,続いて受傷部周辺の線維芽細胞の活性化や遊走の開始する細胞活性期,その活性化した線維芽細胞により産生された細胞外マトリックスによる組織の再構築期を経て創傷治癒は終了する.皮膚では血液成分や炎症細胞が創傷治癒過程に重要な役割を果たしており,これらが産生する増殖因子(TGF- β , EGF, FGFなど)やサイトカイン(IL-1, IL-6, TNF- α など)により治癒反応の制御・調節がなされている²⁶⁾²⁷⁾.一方,角膜は無血管組織であるため皮膚における創傷治癒過程の血液凝固期に相当する時期はないが,基本的に同じような過程で炎症期・細胞活性期・再構築期を経て治癒する.また,角膜では活性化した角膜実質細胞が治癒過程で重要な役割を演じており,角膜実質細胞の機能調節が創傷治癒過程に大きく影響される^{28)~32)}.

角膜切開術と光学的角膜切除術後の経時的な角膜実質の創傷治癒過程は図9のように要約できる.今回検討し

たいずれの術式においても、受傷直後に傷害部断面近傍の角膜実質細胞はアポトーシスにより細胞死が誘導され無細胞領域が形成された。その後、炎症細胞の浸潤による炎症期、活性化した角膜実質細胞が再生上皮下に集簇する細胞活性期、その集簇した角膜実質細胞の細胞外マトリックス成分の合成による再構築期とほぼ同様の経過をたどる角膜反応がみられた。しかし、2種類の外科的侵襲に対する角膜の反応時期あるいは程度は明らかに異なっており、角膜切開では炎症期の反応は強いにもかかわらず、再構築は比較的速やかに進行し、異常マトリックスの集積も徐々に軽減し、3か月後にはかなり正常構造に回復していた。一方、光学的角膜切除術では急性炎症は比較的軽度であったが、細胞活性期から再構築期への移行が遅れること、および再構築期において異常なマトリックスの集積が長期間持続していた。この再構築期の持続は角膜実質細胞の動態と比較的よく一致しており、持続した角膜実質細胞の活性化が関与していると考えられる。また、今回の結果では示さなかったが、光学的切除術6か月後でも実質浅層には細胞外マトリックスが蓄積していた。Andersonら³³⁾やLatvalaら³⁴⁾は術後1年以上経過しても、実質浅層にフィブロネクチンやIV型コラーゲンをみることを報告している。これらの持続した組織再構築が光学的角膜切除術後の問題とされている上皮混濁、hazeと関係していると考えられている。また、光学的角膜切除後の細胞外マトリックスの合成のみならず、MMPs/TIMPsやPA/plasmin系などのマトリックス成分の代謝調節も術後の予後に関係していると考えられている^{35)~38)}。

創傷治癒初期の炎症期にみられる傷害部への細胞浸潤は、強膜・結膜血管由来の多核白血球などの炎症細胞が涙液あるいは角膜輪部から実質内に浸潤してくると考えられている²⁸⁾³⁹⁾。角膜切開では切開創がV字型に開くため、涙液由来の炎症細胞が創傷部への実質に浸潤しやすいため、角膜切開では炎症期の反応が強いと考えられる。一方、光学的角膜切除術では上皮剥離後に実質層を広範囲に照射するため、術後にみられる無細胞領域が広くなり、周囲の活性化した角膜実質細胞の集簇が遅れ、細胞活性期への移行が遅れると考えられる。その後、広範囲に活性化された角膜実質細胞が集簇し、活発な細胞外マトリックス成分の合成を行うために再構築期が持続するものと考えられる。また、光学的角膜切除術とは異なり、広範囲の機械的な角膜切除術も同様に持続的な再構築期が観察されている⁴⁰⁾。さらに、光学的角膜切除術後には活性化された角膜実質細胞から種々のサイトカイン(IL-1, IL-6, TNF- α)、増殖因子(HGF, KGF, TGF- β , PDGF)や細胞外マトリックス成分(FN, TN, SPARC)が合成・分泌されていることが報告^{41)~48)}されており、これら液性因子が角膜上皮細胞あるいは角膜実質細胞に作用して持続的な組織の再構築を引き起こしているのかも知れない。

角膜に侵襲が加わった直後、傷害部の実質層は無細胞領域を形成することはよく知られていた^{28)49)~51)}。しかし、最近の研究でこの無細胞領域の形成にはアポトーシスが関与していることが明らかになり、角膜への侵襲の種類にかかわらず傷害直後に傷害部周辺の角膜実質細胞はアポトーシスが誘導されて無細胞領域を形成し、このアポトーシスの誘導が創傷治癒開始のシグナルとして働いている可能性が報告^{47)52)~54)}されている。今回の我々の結果でも、角膜切開あるいは光学的角膜切除術のいずれの術式によっても、直後から傷害部近傍の角膜実質細胞は核クロマチンの濃縮、アポトーシス小体の形成がみられ、かつTUNEL陽性であったことから、アポトーシスの誘導により細胞死に陥り、無細胞領域が形成されることが確認できた。傷害に反応してアポトーシスが誘導される機序についてはIL-1やFas-Fas ligand系の関与が報告^{55)~57)}されているが、未だ十分に解明されていない。

屈折矯正手術は、透明な角膜に外科的侵襲を加えて、裸眼視力の向上を目指す手術である。そのため、安全性として瞳孔領の透明性の維持は絶対的条件である。同時により良い効果を得るためには、正確なプログラムだけではなく、個々の症例で、矯正効果を制御すること、すなわち、術後の創傷治癒を制御できればより正確な矯正効果を得られるはずである。そのためには、角膜創傷治癒機構やその薬理的制御の解明が今後も益々重要であると考えられる。

稿を終えるに当たり、本研究に際しご指導とご校閲を賜りました山口大学医学部眼科学教室西田輝夫教授に深謝いたしますとともに、多くのご助言をいただいた中村雅胤博士、技術的指導をいただいた山口和人助教授、新宅隆雄博士に感謝いたします。また、実験などで御世話になりました末富美千代氏、武内清枝氏に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第102回日本眼科学会総会(1998年、福岡市)で発表した。

本研究は文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)(課題番号08672019)の助成を受けて行った。

文 献

- 1) **Fyodorov SN, Durnev VV**: Operation of dosaged dissection of corneal circular ligament in the cases of myopia of mild degree. *Ann Ophthalmol* 11: 1885—1890, 1979.
- 2) **McDonald MB, Liu JC, Byrd TJ, Abdelmegeed M, Andrade HA, Klyce SD, et al**: Central photorefractive keratectomy for myopia partially sighted and normally sighted eyes. *Ophthalmology* 98: 1327—1337, 1991.
- 3) **Seiler T, Wollensak J**: Myopic photorefractive keratectomy with the excimer laser one-year follow-up. *Ophthalmology* 98: 1156—1163, 1991.
- 4) **Gartry DS, Muir MGK, Marshall J**: Excimer la-

- ser photorefractive keratectomy 18-month follow-up. *Ophthalmology* 99: 1209—1219, 1992.
- 5) **Pallikaris IG, Siganos DS**: Excimer laser *in situ* keratomileusis and photorefractive keratectomy for correction of high myopia. *J Refract Corneal Surg* 10: 498—510, 1994.
 - 6) **Güell JL, Muller A**: Laser *in situ* keratomileusis (LASIK) for myopia from -7 to -18 diopters. *J Refract Surg* 12: 222—228, 1996.
 - 7) **Salah T, Waring III GO, Maghraby AE, Moadel K, Grimm SB**: Excimer laser *in situ* keratomileusis under a corneal flap for myopia of 2 to 20 diopters. *Am J Ophthalmol* 121: 143—155, 1996.
 - 8) **Binder PS**: Radial keratotomy and excimer laser photorefractive keratectomy for the correction of myopia. *J Refract Corneal Surg* 10: 443—464, 1994.
 - 9) **Waring III GO, Lynn MJ, McDonnell PJ, the PERK Study Group**: Results of prospective evaluation of radial keratotomy (PERK) study 10 years after surgery. *Arch Ophthalmol* 112: 1298—1308, 1994.
 - 10) **Seiler T, McDonnell PJ**: Excimer laser photorefractive keratectomy. *Surv Ophthalmol* 40: 89—118, 1995.
 - 11) **Lee RE, Davison PF, Cintron C**: The healing of linear nonpenetrating wounds in rabbit corneas of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 660—665, 1982.
 - 12) **Jester JV, Villaseñor RA, Miyashiro J**: Epithelial inclusion cysts following radial keratotomy. *Arch Ophthalmol* 101: 611—615, 1983.
 - 13) **Gaster RN, Binder PS, Coalwell K, Berns M, McCord RC, Burstein NL**: Corneal surface ablation by 193 nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 90—98, 1989.
 - 14) **Hanna KD, Pouliquen Y, Waring III GO, Savoldelli 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.
 - 15) **del Pero RA, Gigstad JE, Roberts AD, Klintworth GK, Martin CA, L'Esperance Jr FA, et al**: A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates. *Am J Ophthalmol* 109: 419—429, 1990.
 - 16) **Fantes FE, Hanna KD, Waring III GO, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M**: Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 108: 665—675, 1990.
 - 17) **Hanna KD, Pouliquen YM, Savoldelli M, Fantes F, Thompson KP, Waring III GO, et al**: Corneal wound healing in monkeys 18 months after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Corneal Surg* 6: 340—345, 1990.
 - 18) **Jester JV, Villaseñor RA, Schanzlin DJ, Cavanagh HD**: Variations in corneal wound healing after radial keratotomy: Possible insights into mechanisms of clinical complications and refractive effects. *Cornea* 11: 191—199, 1992.
 - 19) **Murakami J, Nishida T, Otori T**: Coordinated appearance of $\beta 1$ integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 120: 86—93, 1992.
 - 20) **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.
 - 21) **Linna T, Tervo T**: Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* 16: 640—649, 1997.
 - 22) **古谷幸子**: エキシマレーザー照射によるラット角膜細胞外マトリックスの局在変化. *日眼会誌* 102: 229—238, 1998.
 - 23) **Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV**: Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 487—501, 1998.
 - 24) **Clark RAF**: Cutaneous wound repair: A review with emphasis on integrin receptor expression. In: Janssen H, et al (Eds): *Wound Healing*. Wrightson Biomedical Publishing, Petersfield, 7—17, 1991.
 - 25) **Clark RAF**: Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* 11: 647—666, 1993.
 - 26) **McKay IA, Leigh IM**: Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol* 124: 513—518, 1991.
 - 27) **Gailit J, Clark RAF**: Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 6: 717—725, 1994.
 - 28) **Binder PS, Wickham MG, Zavala EY, Akers PH**: Corneal anatomy and wound healing. In: Barraquer JL, et al (Eds): *Symposium on Medical and Surgical Diseases of the Cornea*. CV Mosby, St Louis, 1—35, 1980.
 - 29) **Nishida T**: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 4: 4—13, 1993.
 - 30) **Gipson IK, Inatomo T**: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 6: 3—10, 1995.
 - 31) **Nishida T, Tanaka T**: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 7: 2—11, 1996.
 - 32) **Nishida T**: Biology of corneal stromal keratocytes. In: Kinoshita S, et al (Eds): *1st Annual Meeting*

- of the Kyoto Cornea Club. Kugler, Amsterdam, 43—49, 1997.
- 33) **Anderson JA, Binder PS, Rock ME, Vrabc MP** : Human excimer laser keratectomy. Immunohistochemical analysis of healing. *Arch Ophthalmol* 114 : 54—60, 1996.
 - 34) **Latvala T, Tervo K, Mustonen R, Tervo T** : Expression of cellular fibronectin and tenascin in the rabbit cornea after excimer laser photorefractive keratectomy : A 12-month study. *Br J Ophthalmol* 79 : 65—69, 1995.
 - 35) **Lohmann CP, O'Brart D, Patmore A, Muir MK, Marshall J** : Plasmin in the tear fluid : A new therapeutic concept to reduce postoperative myopic regression and corneal haze after excimer laser photorefractive keratectomy. *Lasers Light Ophthalmol* 5 : 205—210, 1993.
 - 36) **Lohmann CP, Marshall J** : Plasmin- and plasminogen-activator inhibitors after excimer laser photorefractive keratectomy : New concept in prevention of postoperative myopic regression and haze. *J Refract Corneal Surg* 9 : 300—302, 1993.
 - 37) **Azar DT, Hahn TW, Jain S, Yeh YC, Stetler-Stevensen WG** : Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea* 15 : 18—24, 1996.
 - 38) **Ye HQ, Azar DT** : Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 913—921, 1998.
 - 39) **Robb RM, Kuwabara T** : Corneal wound healing. I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds. *Arch Ophthalmol* 68 : 636—642, 1962.
 - 40) **Malley DS, Steinert RF, Puliafito CA, Dobi ET** : Immunofluorescence study of corneal wound healing after excimer laser anterior keratectomy in the monkey eye. *Arch Ophthalmol* 108 : 1316—1322, 1990.
 - 41) **Virtanen T, Ylatupa S, Mertaniemi P, Partanen P, Tuunanen T, Tervo T** : Tear fluid cellular fibronectin levels after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 11 : 106—112, 1995.
 - 42) **Latvala T, Puolakkainen P, Vesaluoma M, Tervo T** : Distribution of SPARC protein (osteonectin) in normal and wounded feline cornea. *Exp Eye Res* 63 : 579—584, 1996.
 - 43) **Malecaze F, Simorre V, Chollet P, Tack JL, Muraine M, le Guellec D, et al** : Interleukin-6 in tear fluid after photorefractive keratectomy and its effects on keratocytes in culture. *Cornea* 16 : 580—587, 1997.
 - 44) **Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, et al** : Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res* 64 : 501—504, 1997.
 - 45) **Vesaluoma M, Teppo AM, Gronhagen-Riska C, Tervo T** : Increased release of tumour necrosis factor- α in human tear fluid after excimer laser induced corneal wound. *Br J Ophthalmol* 81 : 145—149, 1997.
 - 46) **Vesaluoma M, Teppo AM, Gronhagen-Riska C, Tervo T** : Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in tear fluid : A potential modulator of corneal wound healing following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* 16 : 825—831, 1997.
 - 47) **Wilson SE** : Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon : Programmed cell death and wound healing. *J Refract Surg* 13 : 171—175, 1997.
 - 48) **Kaji Y, Mita T, Obata H, Tsuru T, Soya K, Shirasawa E, et al** : Expression of transforming growth factor β superfamily and their receptors in the corneal stromal wound healing process after excimer laser keratectomy. *Br J Ophthalmol* 82 : 462—463, 1998.
 - 49) **Maumenee AE, Kornblueth W** : Regeneration of the corneal stromal cells. *Am J Ophthalmol* 31 : 699—702, 1948.
 - 50) **Matsuda H, Smelser GK** : Electron microscopy of corneal wound healing. *Exp Eye Res* 16 : 427—442, 1973.
 - 51) **Campos M, Raman S, Lee M, McDonnell PJ** : Keratocyte loss after different methods of de-epithelialization. *Ophthalmology* 101 : 890—894, 1994.
 - 52) **Gao J, Gelber-Schwalb TA, Addeo JV, Stern ME** : Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Cornea* 16 : 200—208, 1997.
 - 53) **Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE** : Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 276—283, 1998.
 - 54) **Wilson SE, Kim W-J** : Keratocyte apoptosis : Implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 220—226, 1998.
 - 55) **Wilson SE, He Y-G, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, et al** : Epithelial injury induces keratocyte apoptosis : Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 62 : 325—337, 1996.
 - 56) **Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, et al** : The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1582—1592, 1996.
 - 57) **Mohan RR, Liang Q, Kim W-J, Helena MC, Baerveldt F, Wilson SE** : Apoptosis in the cornea : Further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res* 65 : 575—589, 1997.