

外科的角膜侵襲に対する内皮細胞の初期反応の形態学的研究

宮崎 勝徳¹⁾²⁾, 田中 俊朗¹⁾, 西田 輝夫¹⁾

¹⁾山口大学医学部眼科学教室, ²⁾現九州大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：手術侵襲に対する角膜内皮の反応性を知る目的で、術後の角膜内皮の形態変化を経時的に検討した。

方 法：家兎眼に角膜切開、上皮剝離、エキシマレーザー照射の3種の処置を行い、各処置の6時間、1, 3日、1, 2週後に光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察した。

結 果：いずれの処置においても直後から内皮細胞間に空隙をみたが、前房側先端のtight junctionは保たれていた。一方、細胞質内には多数のゴルジ器官、粗面小胞体、分泌顆粒があり細胞の活性化がみられたが、観察期間を通じ細胞の変性はなかった。各処置でみられた内皮細胞

胞間隙は、回復速度は異なるものの、いずれも上皮修復の後、最終的に正常に回復した。

結 論：角膜切開、上皮剝離、エキシマレーザー照射の外科的侵襲に対して、角膜内皮は侵襲直後から上皮障害による水分の貯留による影響を受けるものの、その反応は形態学的に可逆的な反応であることが推定された。

(日眼会誌 103 : 350—355, 1999)

キーワード：角膜内皮細胞, 角膜上皮剝離, 角膜切開, エキシマレーザー, 創傷治癒

Morphological Changes in Rabbit Corneal Endothelium after Surgical Injuries

Masanori Miyazaki¹⁾²⁾, Toshiro Tanaka¹⁾ and Teruo Nishida¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

²⁾Current Affiliation : Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

Purpose : To understand the responses of the corneal endothelium to different types of surgery, we chronologically investigated the morphologic changes in the endothelial cells.

Methods : We did a mechanical incision, epithelial ablation, and excimer laser radiation on rabbit corneas and observed the morphologic changes in the endothelial cells for up to 2 weeks after surgery under a light microscope and an electron microscope.

Results : Although we observed enlarged intercellular spaces between neighboring endothelial cells, intercellular adhesion kept the cells tightly joined near their apices immediately after each procedure. No signs of endothelial cell degeneration were ob-

served after the procedures, but we did observe many Golgi apparatus, rough-surfaced endoplasmic reticula, and secreted granules, indicating that the cells had been activated. After each procedure, the intercellular junctions and spaces required different amounts of time to return to normal.

Conclusions : These results suggest that the different kinds of surgical injuries affected the corneal endothelium but that the changes were reversible. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 350—355, 1999)

Key words : Corneal endothelium, Photorefractive keratectomy, Radial keratotomy, Excimer laser

I 緒 言

角膜内皮は角膜後面を被覆する一層の多角形細胞で構成されている。角膜は元来実質の吸水圧および前房側からの眼圧により膨潤しやすい性質をもつが、角膜実質の膨潤に対抗して角膜実質の含水率を制御しているのが内

皮細胞のバリアー機能およびポンプ機能である。角膜内皮細胞間には多数の細胞間結合が存在するが、前房に面した先端部には強固な結合でありながら、ある程度水の通過を許すという構造である focal tight junction が存在し、バリアーとしての機能を果たしている。また、内皮細胞内のイオンを細胞間隙へ能動輸送することによって浸

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 西田 輝夫

(平成 10 年 9 月 18 日受付, 平成 10 年 12 月 2 日改訂受理)

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

(Received September 18, 1998 and accepted in revised form December 2, 1998)

透圧勾配が生じ、その勾配に従って実質中から前房への水の移動が生じるポンプ機能も存在する。これらのバリアー機能およびポンプ機能により、内皮細胞は角膜実質内の水分調節を行い、角膜透明性の恒常性維持に極めて重要な役割を担っている^{1)~3)}。

屈折異常を矯正する目的で近年、透明角膜に対して外科的侵襲が加えられている。しかし、屈折矯正手術は元来透明な角膜で十分な矯正視力を有する眼に対する手術であり、その合併症により透明性を失うことがあってはならない。これまで基礎および臨床両面にわたる研究により、いくつかの屈折矯正手術に対する角膜への影響や問題点が指摘されている^{4)~8)}。特に内皮細胞はヒトにおいては生後ほとんど分裂能を示さないことから、その侵襲に対する角膜内皮細胞の反応性を理解することは屈折矯正手術のみならず、角膜に対する手術の術後管理を把握する上でも非常に重要である。

今回、種々の角膜に対する外科的侵襲に対する内皮細胞の経時的な変化を理解するために、家兎眼に角膜切開、上皮剥離、エキシマレーザー照射の3種の処置を行い、内皮細胞の初期変化を経時的に光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて形態学的に観察した。

II 実験方法

日本白色家兎(雄, 1.5 kg, KBT オリエンタル, 32 匹)に塩酸ケタミン(ケタラール[®])とキシラジン塩酸塩(セラクター[®])による全身麻酔および4%リドカイン点眼麻酔下で、角膜切開、上皮剥離およびエキシマレーザー照射の3種類の処置を行った。角膜切開はダイヤモンドナイフ(Katena 社製)を用い、250 μm の深度で角膜中央部を6 mm 直線切開した。上皮剥離は、角膜中央部を直径6 mm の円形でゴルフ刀を用いて機械的に剥離した。エキシマレーザー照射は、上皮剥離後にエキシマレーザー発生装置(EC-5,000, NIDEK 社)を用い、直径6 mm の範囲を本装置における3D相当の photorefractive keratectomy (PRK) モードで実質を切除した。

各処置の6時間、1, 3日, 1, 2週後に、十分量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタール[®])耳静脈内投与により安楽死させ、直後に2%グルタルアルデヒドを用い灌流固定を行った。眼球摘出後、2%グルタルアルデヒドおよび2%四塩化オスミウムによる二重固定を行った。アセトンによる脱水の後、エポキシ樹脂による包埋を行った。その後、光学顕微鏡用切片を作製してトルイジン

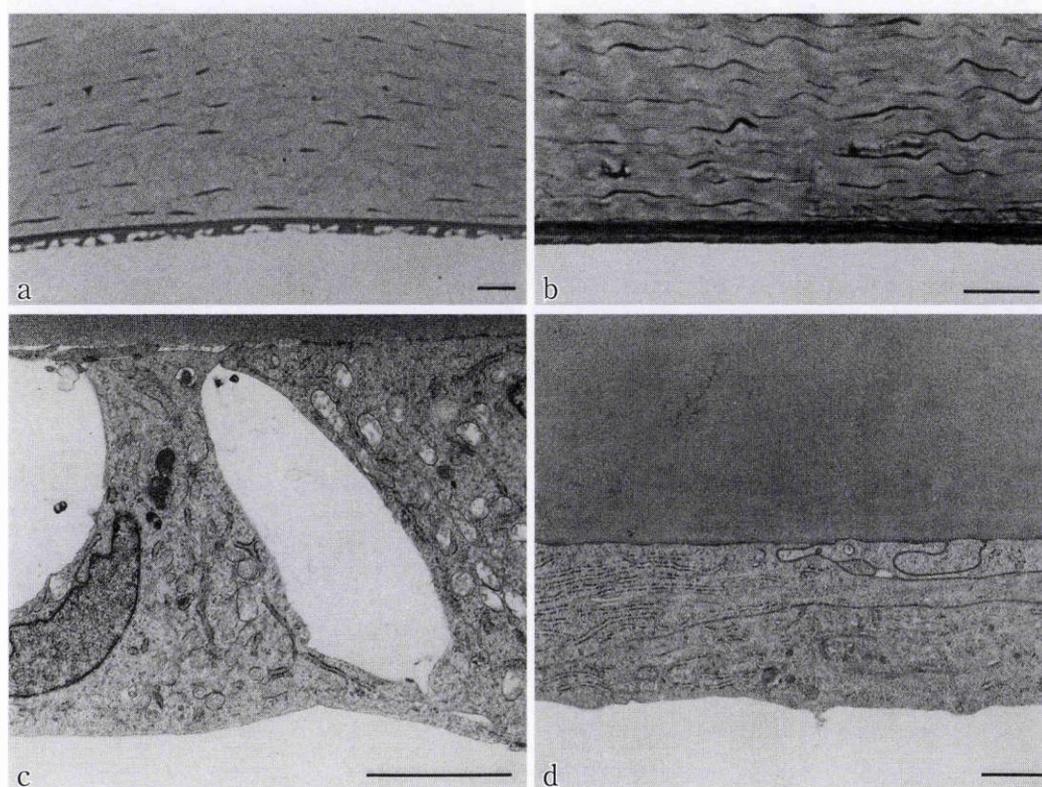


図1 角膜切開後の形態変化。

a: 6時間後の光学顕微鏡写真(トルイジンブルー染色)。切開部直下の内皮細胞層には空胞がみられた。バーは50 μm 。b: 1日後の光学顕微鏡写真。内皮細胞層の空胞は消失し、正常角膜内皮細胞と同じ形態を示した。バーは50 μm 。c: 6時間後の透過型電子顕微鏡写真。切開部直下の内皮細胞層の細胞間には開離していた。細胞質内には多数のゴルジ器官、粗面小胞体、分泌顆粒があり細胞の活性化がみられたが、前房側先端の tight junction には開離をみなかった。バーは1 μm 。d: 角膜切開1日後の透過型電子顕微鏡写真。内皮細胞内の小器官の構造は正常化し、内皮細胞間隙は消失して、正常角膜内皮細胞と同じ形態を示した。バーは1 μm 。

ブルー染色による組織学的観察を光学顕微鏡(Axioskop 50, Zeiss 社, ドイツ: 以下, 光顕)で行った. 次に超薄切切片を作製し, 酢酸ウランおよび硝酸鉛による二重染色後に透過型電子顕微鏡(JOEL-200 X, 日本電子: 以下, 電顕)を用いて微細構造の観察を行った.

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.

III 結 果

1. 角膜切開

切開後 6 時間の光顕による観察では, 切開創は V 字型に開離し, 切開創への上皮伸展はほとんどなかった. 角膜実質断面は涙液中の水分の浸透により浮腫を呈し, 厚みを増していた. また, 切開部直下の内皮細胞層には空胞がみられた(図 1 a). 電顕を用いて観察したところ, この空胞は内皮細胞間の開離により生じており, 細胞内における空胞の形成はなかった. 内皮細胞の前方側先端に存在する apical tight junction には離開をみなかった(図 1 c).

細胞質内には多数のゴルジ器官, 粗面小胞体や分泌顆粒がみられることより細胞の活性化が生じていると判断された. 切開部直下以外の角膜内皮細胞は正常構造を維持していた. 1 日後では, 切開部は上皮細胞により再被覆され, 角膜の浮腫も消失し, 内皮細胞内の小器官の構造は正常化し, 空胞を形成していた内皮細胞間隙は消失して, 正常角膜内皮細胞と同じ形態を示していた(図 1 b, d). 以後 3 日, 1, 2 週間後も内皮細胞層に変化はなかった.

2. 上皮剥離

上皮剥離 6 時間後, 光顕による観察では上皮の再被覆はみられず, 上皮欠損部の実質は涙液中の水分の浸透により浮腫を呈し, 肥厚していた. また, 上皮剥離部直下の内皮層には空胞がみられた(図 2 a). この空胞を電顕で観察すると, 角膜切開後に観察されたと同様に内皮細胞間の間隙として観察された. また, 細胞質内には多数のゴルジ器官, 粗面小胞体, 分泌顆粒があり細胞の活性化がみられた(図 2 c). 上皮剥離部直下以外の角膜内皮細胞は正常構造を維持していた. 3 日目には, 剥離部位は上皮細胞で再被覆され, 上皮細胞の重層化も観察されて上皮の修復は進行しており, 角膜の浮腫も消失していた. 一方, 内皮細胞間の空隙(空胞)は程度が軽減しているものの残存し

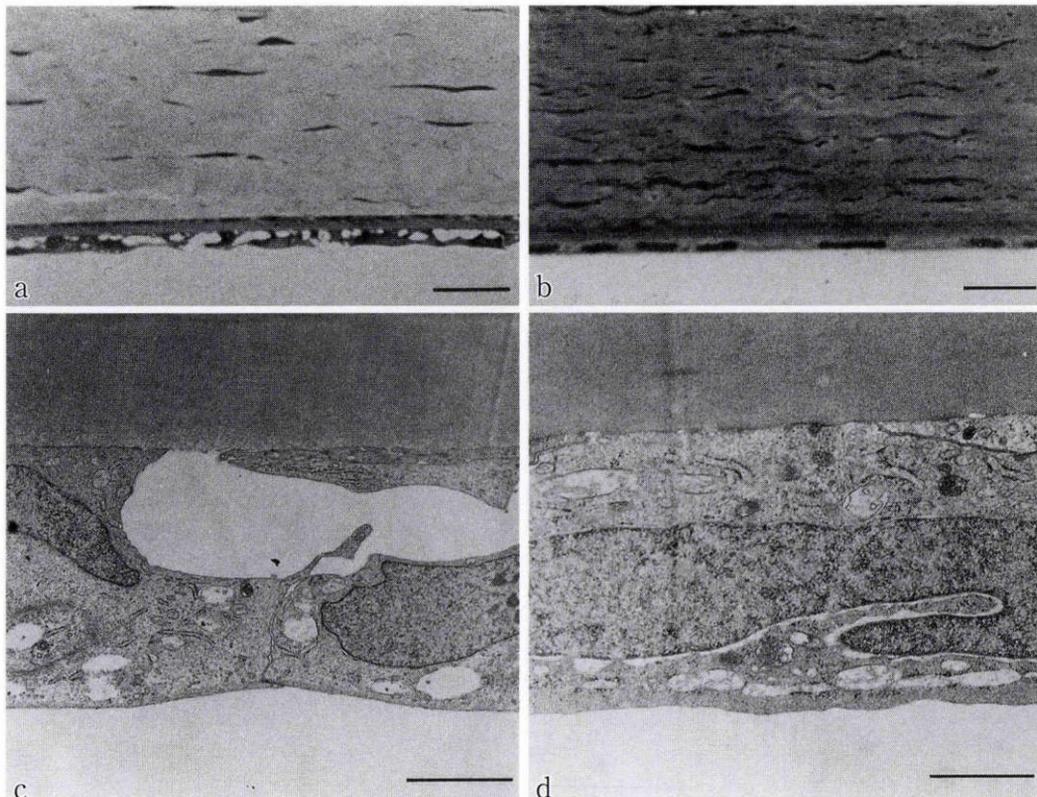


図 2 上皮剥離後の形態変化.

a: 6 時間後の光学顕微鏡写真(トルイジンブルー染色). 上皮剥離部直下の内皮細胞層には空胞がみられた. バーは 50 μm . b: 1 週後の光学顕微鏡写真. 内皮細胞層の空胞は消失し, 正常角膜内皮細胞と同じ形態を示した. バーは 50 μm . c: 6 時間後の透過型電子顕微鏡写真. 上皮剥離部直下の内皮細胞層には細胞間の間隙がみられた. 細胞質内には多数のゴルジ器官, 粗面小胞体, 分泌顆粒があり細胞の活性化がみられた. バーは 1 μm . d: 上皮剥離 1 週後の透過型電子顕微鏡写真. 内皮細胞内の小器官の構造は正常化し, 内皮細胞間隙は消失して, 正常角膜内皮細胞と同じ形態を示した. バーは 1 μm .

ていた。1 週目では、上皮細胞はさらに分化傾向を呈し、内皮細胞は光顕的にも電顕的にも正常角膜内皮細胞と同様の形態に回復していた(図 2 b, d)。以後 2 週目も同様に内皮細胞層に変化はなかった。

3. エキシマレーザー

照射後 6 時間では、上皮の再被覆はみられず、角膜切開や上皮剥離後に観察されたのと同様に、照射部直下の内皮細胞間の apical tight junction は離開せずに内皮細胞間に空隙がみられた。細胞質内には多数のゴルジ器官、粗面小胞体、分泌顆粒があり細胞の活性化がみられた(図 3 a, c)。照射部直下以外の角膜内皮細胞は正常構造を維持していた。3 日目には、上皮欠損の再被覆は完了し、角膜の浮腫も消失していたが、内皮細胞間には照射 6 時間後と同様な空隙(空胞)をみた。1 週間目では、上皮細胞は増殖し基底細胞への分化傾向を示したが、上皮剥離とは異なり、内皮細胞間には依然空隙が残存していた。照射後 2 週間では、内皮細胞層における空胞形成はみられず、電顕的にも正常と同様の形態に回復していた(図 3 b, d)。

IV 考 按

今回、角膜切開、上皮剥離およびエキシマレーザー照射

の 3 種類の侵襲に対する角膜内皮細胞の初期の反応性を形態学的に検討した。その結果、いずれの侵襲においても侵襲直後から角膜内皮細胞間に空隙を生じる変化を観察した。しかし、侵襲の種類によりその回復速度は異なるものの、上皮修復とともに空隙は消失し、侵襲に対する角膜内皮の初期反応は形態学的に可逆的であることが推定された。

角膜は、実質の吸水圧および眼圧による水の静水圧により膨張しやすい性質を有する。この性質に対し、角膜厚を一定に保つメカニズムは依然として不明な点が多いが、Maurice により提唱された pump-leak 理論¹⁾が広く受け入れられている。角膜内皮細胞間は約 25~45 nm であり、所々約 3 nm と狭くなり緩やかな結合である apical gap junction を形成するが、一方、前房側先端部は角膜上皮のそれと異なり、一部隙間のある focal tight junction が存在し、強固な結合でありながらある程度水の通過を許す性質を有する²⁾。また、内皮細胞はその細胞膜に多数の Na-K pump を有し、能動輸送により細胞間隙の Na 濃度を上昇させ、その浸透圧勾配により実質から内皮細胞間に水分を吸収し前房へ排出する³⁾とされている。これらのバリアー機能およびポンプ機能により、角膜実質

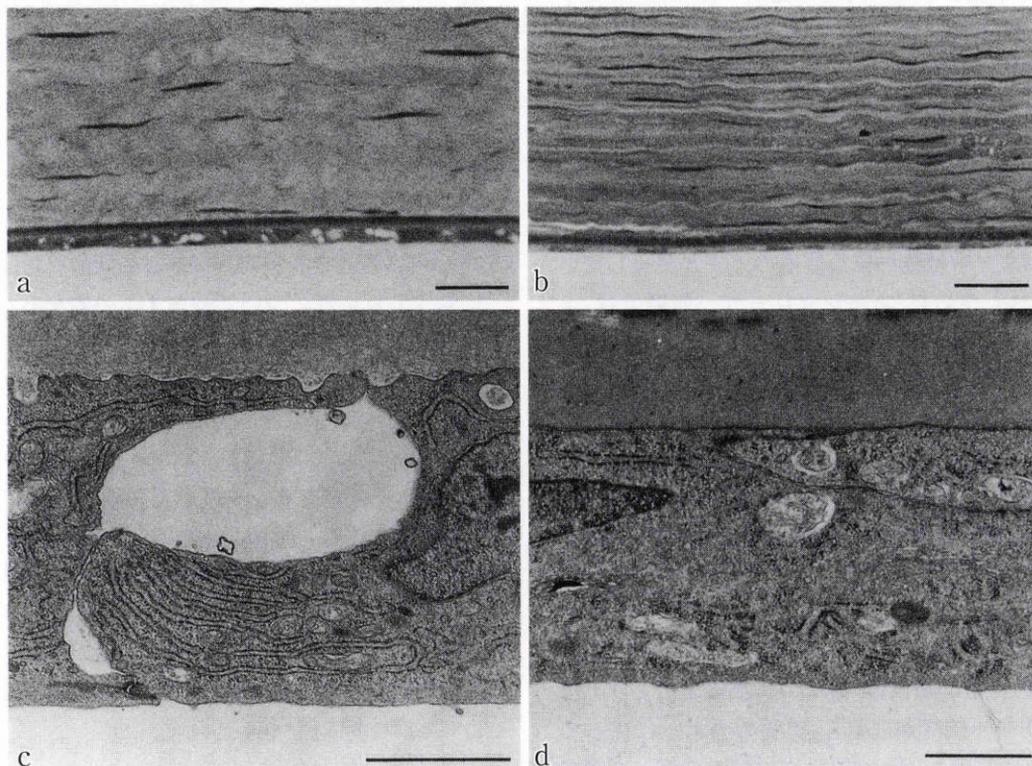


図 3 エキシマレーザー照射後の形態変化。

a: 6 時間後の光学顕微鏡写真(トルイジンブルー染色)。照射部直下の内皮細胞層には空胞がみられた。バーは 50 μm 。b: 2 週後の光学顕微鏡写真。内皮細胞層の空胞は消失し、正常角膜内皮細胞と同じ形態を示した。バーは 50 μm 。c: 6 時間後の透過型電子顕微鏡写真。照射部直下の内皮細胞層には細胞間に空隙がみられるが、apical tight junction は離開していなかった。細胞質内には多数のゴルジ器官、粗面小胞体、分泌顆粒を認め細胞の活性化がみられた。バーは 1 μm 。d: 2 週後の透過型電子顕微鏡写真。内皮細胞内の小器官の構造は正常化し、内皮細胞間隙は消失して、正常角膜内皮細胞と同じ形態を示した。バーは 1 μm 。

表1 各種角膜侵襲に対する経時的な角膜上皮の被覆と内皮の形態変化

		6時間	1日	3日	1週	2週
角膜切開	上皮被覆	-	+	+	+	+
	内皮変化	+	-	-	-	-
上皮剝離	上皮被覆	-	-	+	+	+
	内皮変化	+	+	+	-	-
照射	上皮被覆	-	-	+	+	+
	内皮変化	+	+	+	+	-

上皮被覆；+：被覆，-：未被覆
内皮変化；+：形態変化あり，-：形態変化なし

は適度な含水量を維持し一定の厚みと透明性を保っている。しかしながら、角膜上皮が障害を受けると内皮細胞のポンプ機能は変化しないが、涙液などの水分の実質への流入が増加し、角膜圧を一定に保つことができなくなり角膜保水が生じて浮腫に陥る。一方、前房内炎症により角膜内皮細胞の機能が低下すると上皮が無傷であっても、実質からの水分の排出が低下し同様に実質浮腫を呈する。

今回、角膜切開、上皮剝離およびエキシマレーザー照射の種々の侵襲に対する角膜内皮細胞層の変化を、形態学的に観察した結果を角膜上皮の創傷治癒過程と角膜内皮の形態学的変化の回復について表1にまとめた。切開については上皮再被覆の完了とともに内皮細胞間の空隙は消失していた。上皮剝離およびエキシマレーザー照射に関しては、上皮の再被覆と内皮の形態変化の回復との間に時間的ずれを生じていた。これは、内皮細胞の修復は侵襲後の上皮バリアー機能の修復速度の差異と関連しているかも知れない。さらに、エキシマレーザー照射では、上皮剝離に比して空隙の回復に時間を要した。これはエキシマレーザー照射では上皮のみならず、広範囲の実質に侵襲を加えているため、侵襲の程度に依存し内皮細胞の修復に時間を要すると考えられた。細胞質内には多数のゴルジ器官、粗面小胞体、分泌顆粒があり細胞の活性化が推定されたが、観察期間を通じ細胞の変性はなかった。したがって、いずれの侵襲に対しても内皮の形態学的変化は上皮修復とともに消失し、その初期変化は可逆的であると考えられた。いずれの侵襲に対しても内皮細胞間隙に空隙を生じた。この原因は、種々の角膜侵襲により上皮の強固なバリアー機構が破綻し、実質の吸水圧に従って水分が実質中に貯留し、その結果、内皮細胞のポンプ機能を越えた水分が細胞間隙に貯留したためと考えられた。しかし、形態学的には前房側先端の tight junction には離開がみられず、内皮細胞のバリアーやポンプ機能は破綻していないため、上皮修復に伴い実質に侵入する水分が減少すると、内皮細胞層は形態学的に正常化したと考えられた。近年、屈折異常矯正のため放射状角膜切開術

(radial keratotomy；以下、RK)や、エキシマレーザーによる PRK および laser *in situ* keratomileusis (以下、LASIK)などの屈折矯正手術が開発され、諸外国で臨床的有用性と同時にそれらの手術の限界や併発症についても報告^{4)~8)}されてきている。RK は角膜前面を放射状に切開することで、急峻化した周辺部角膜からの張力が光学領域に作用して平坦化・遠視化が生じる。一方 PRK, LASIK は角膜実質をエキシマレーザーのエネルギーで蒸散させ除去し角膜前面の曲率を減ずる。いずれの手技にも共通する問題点は、術後の予想屈折度への正確な到達および術後合併症の発生防止をいかに成し遂げるかである。そのどちらも手術侵襲に対する角膜の創傷治癒反応の程度に大きく依存しており、とりわけ角膜内皮細胞は、ヒトにおいては障害の不可逆性および担う機能の重要性から、最も注目すべきであると考えられる。RK による内皮細胞への影響については、切開部直下の内皮細胞の多形性と浮腫肥厚をみたとの報告⁴⁾や、内皮細胞数の減少をみたという報告⁵⁾がある。一方、PRK に関しては、家兎眼を用いた実験においてデスメ膜内に高電子密度の物質が生じるという報告^{6)~8)}があり、また、切開深度がデスメ膜へ 40 μm 以内の距離まで到達すると、照射部直下の角膜内皮細胞の脱落消失がみられるとの報告⁹⁾がある。今回種々の侵襲に対する角膜内皮の反応性を検討した結果、侵襲直後の形態学的変化は角膜に水分が貯留し、形態学的に変化はみられたが、その変化は可逆的であり、内皮障害は生じないと考えられた。しかしながら、本研究は自己再生能力のある家兎角膜で行われたものであり、ヒトにおいて角膜実質の脆弱性による角膜変形などがあり、長期にわたる角膜内皮細胞への侵襲や障害がないとは本研究からは明言できない。さらに、長期的な角膜内皮の侵襲に対する反応性について観察する必要がある。

屈折矯正手術は、新しい手術法として眼科医療の一角を担っていくことは明白である。現段階では角膜の創傷治癒がその成果に大いに寄与するこの術式において、個々の術式による差異を含めたその機序の解明と制御が、より安全で有効な屈折矯正手術の発展に不可欠と考えられる。

稿を終えるに当たり、本研究に際し多くのご助言をいただいた山口大学医学部眼科学教室中村雅胤博士、技術的指導を頂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。

文 献

- 1) Maurice DM: The cornea and sclera. In: Davson H (Ed): The Eye. vol 1. Academic Press, New York, 289-368, 1962.
- 2) Hirsch M, Renard G, Faure J-P, Pouliquen Y: Study of the ultrastructure of the rabbit corneal

- endothelium by the freeze-fracture technique : Apical and lateral junctions. *Exp Eye Res* 25 : 277—288, 1977.
- 3) **Kuang K, Xu M, Koniarek JP, Fischbarg J** : Effects of ambient bicarbonate, phosphate and carbonic anhydrase inhibitors on fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res* 50 : 487—493, 1990.
 - 4) **Stainer GA, Shaw EL, Binder PS, Zavala EY, Akers P** : Histopathology of a case of radial keratotomy. *Arch Ophthalmol* 100 : 1473—1477, 1982.
 - 5) **Chiba K, Tsubota K, Oak SS, Laing RA** : Morphometric analysis of corneal endothelium following radial keratotomy. *J Cataract Refract Surg*. 13 : 263—267, 1987.
 - 6) **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.
 - 7) **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.
 - 8) **伊東真由美, 高橋次郎, 伏見典子, 崎元 卓, 澤 充** : 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. *日眼会誌* 101 : 801—807, 1997.
 - 9) **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.
-