

ホルミウムヤグレーザー照射後のラット角膜細胞外マトリックス成分の局在変化

田中 俊朗, 古谷 幸子, 中村 雅胤, 西田 輝夫

山口大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：ホルミウムヤグレーザー (Holmium YAG laser, Ho : YAG laser) 照射に対する角膜の反応性を知る目的で, 角膜の細胞外マトリックスの局在変化を免疫組織学的に検討した。

方 法：ラット角膜に Ho : YAG laser を照射し, 経時的に組織学的検討と蛍光抗体法を用いて, I 型コラーゲン, フィブロネクチン, IV 型コラーゲンおよびラミニンの局在を観察した。

結 果：Ho : YAG laser 照射 1 日後, 角膜実質の収縮があった。照射部の角膜実質細胞は消失して無細胞域となっていたが, 1 週間後には照射部に遊走してきた。I 型コラーゲンの局在は照射前後で変化はなかった。フィブ

ロネクチンは照射後いったん消失した後, 無細胞域に遊走してきた角膜実質細胞に一致して強い蛍光が観察された。一方, 基底膜成分である IV 型コラーゲンおよびラミニンは照射していない角膜と同様に観察された。

結 論：Ho : YAG laser 照射による熱エネルギーは角膜実質のコラーゲンの収縮に有効であり, 上皮細胞や上皮基底膜への侵襲は少ないことが推測された。(日眼会誌 103 : 633—640, 1999)

キーワード：ホルミウムヤグレーザー, 角膜, 細胞外マトリックス, 創傷治癒

Localization of Extracellular Matrix Proteins after Holmium YAG Laser Radiation in Rat Cornea

Toshiro Tanaka, Sachiko Furutani-Miura, Masatsugu Nakamura and Teruo Nishida

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

Abstract

Purpose : To understand corneal responses to holmium YAG (Ho : YAG) laser radiation, we used immunofluorescent microscopy to examine changes in the localization of extracellular matrix proteins.

Methods : Rats were radiated with an Ho : YAG laser. On days 1, 3, and 7 after radiation, the eyes were enucleated and frozen. The cryosections were stained by immunofluorescent microscopy using antibodies against type I collagen, fibronectin, type IV collagen, and laminin.

Results : One day after Ho : YAG laser radiation, contraction of the stromal collagen fibrils was observed. Keratocytes could not be observed at the radiated stromal region on day 1 after radiation. One week after radiation, keratocytes returned to the radiated area. Although the stromal collagen fibrils

were contracted, they were stained by an antibody against type I collagen. Dense fluorescence for fibronectin was observed at the margin of the stromal acellular zone. Both laminin and type IV collagen were observed at the basement membrane under the corneal epithelium regardless of whether the corneas were radiated or not.

Conclusions : These results suggest that Ho : YAG laser radiation might be useful for collagen contraction of the stroma, without causing serious damage to the corneal epithelium or the basement membrane. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 633—640, 1999)

Key words : Cornea, Extracellular matrix proteins, Holmium YAG laser, Wound healing

別刷請求先 : 755-8505 宇部市南小串 1-1-1 山口大学医学部眼科学教室 西田 輝夫

(平成 10 年 12 月 25 日受付, 平成 11 年 5 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Teruo Nishida, M.D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine. 1-1-1 Minamikogushi, Ube 755-8505, Japan

(Received December 25, 1998 and accepted in revised form May 7, 1999)

I 緒 言

近年、角膜屈折矯正手術への関心が高まり、屈折異常の矯正のために透明な角膜に対して種々の外科的侵襲を加える術式が試みられている。これらの手術の中でも、角膜に切開を加えて角膜の張力を変化させることにより屈折矯正を行う放射状角膜切開術 (radial keratotomy, RK) および角膜にエキシマレーザー照射を行い、角膜の形状を変化させることにより屈折矯正を行う photorefractive keratectomy (PRK) が広く行われている。これらの術式に対する臨床成績も数多く報告^{1)~3)}されており、その効果と限界についてかなり認識されてきている。

一方、角膜に熱を加えて角膜実質コラーゲンを熱収縮させることにより、角膜形状を変化させる術式である角膜熱形成術は古くから試みられている⁴⁾⁵⁾。当初は熱プローブを用いて円錐角膜の治療に応用され⁶⁾⁷⁾、その後、遠視矯正術として開発が進められていた⁸⁾が、術後の屈折値の予測性が低いこと、術後角膜乱視の発生、角膜創傷治癒遅延などの問題のためにあまり広く普及しなかった⁹⁾¹⁰⁾。1980年代後半から熱プローブに代わり、レーザー光を角膜に照射して遠視矯正を行う方法が試みられてきた。近年ではホルミウムヤグレーザー (Ho:YAG laser) の熱エネルギーを利用した遠視矯正術が試みられ、米国では臨床試験が行われている^{11)~13)}。

屈折矯正手術は、術後の屈折を予測することが手術の性格上極めて重要である。術後の屈折力は屈折矯正手術という侵襲に対する角膜の生体反応、すなわち、角膜創傷治癒反応に依存すると考えられる。したがって、よりよい術後成績を得るためには個々の術式における角膜生体反応を理解することが不可欠である。特に、角膜の細胞外マトリックス成分は単なる支持組織としてではなく、細胞の移動、増殖、分化などの細胞機能を調節しており、正常角膜の形態や恒常性維持のみならず、外科的侵襲に対する種々の生体反応に関与し、角膜創傷治癒過程で重要な役割を果たしている¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで、今回我々は Ho:YAG laser 照射後の角膜の創傷治癒反応を知る目的で、ラット角膜を用いて照射後の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について免疫組織学的に検討した。

II 実験方法

1. 実験動物および材料

ラット (Wistar-Kyoto 系, 雄, 300~400 g, 13 匹) は成和実験動物研究所から購入した。ペントバルビタールナトリウム (ネプタール[®]) 溶液は大日本製薬から購入した。ウサギ血清抗ヒトおよびヤギ I 型コラーゲン抗体、ウサギ血清抗ウシ IV 型コラーゲン抗体、ウサギ血清抗ヒトフィブロネクチン抗体、ウサギ血清抗マウスラミニン抗体はエル・エス・エル株式会社から、ウサギ全血清、

fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ IgG 抗ウサギ IgG 抗体は Organon Teknika Corporation (Aurora, OH, 米国) から、ウシ血清アルブミン (BSA, fraction-V) および蛍光分析用グリセリンはナカライテスク社から購入した。OCT compound および cryomold 2 号は Miles 社 (Elkhart, IN, 米国) から購入した。

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. ラット角膜組織への Ho:YAG laser 照射

ラットをペントバルビタールナトリウム (ネプタール[®]) 溶液 (30 mg/kg) の腹腔内注射で麻酔し、Ho:YAG laser (Sunrise Technologies 社製, 波長 2.1 μm , 250 ms, 5 Hz pulse repetition frequency (PRF), 10 pulses/spot, 9 J/cm²) を用いて 10 匹のラットの両眼に角膜 1 個当たり 6~9 か所の照射を行った。Ho:YAG laser 照射を行わない無処置のラット 3 匹を対照として用いた。

Ho:YAG laser 照射後、抗生物質の点眼などの術後処置を行わなかったが、研究期間中に感染や潰瘍などの重篤な角膜障害は 1 例もなかった。

3. 組織学的および蛍光抗体法による観察

Ho:YAG laser 照射 1 日後 (3 匹), 3 日後 (4 匹) および 1 週間後 (3 匹) に、ラットを麻酔死させ、速やかに全眼球を摘出した。眼球を OCT compound 中に包埋し、アセトン・ドライアイス中で凍結した後、microtome cryostat (HM 505 N, Zeiss, Oberkochen, ドイツ) を用いて厚さ 6~8 μm の凍結切片を作製した。切片を 1% BSA を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (BSA-PBS) と 1 時間室温で反応させ非特異的吸着を防止した後、希釈した一次抗体 (ウサギ血清抗ヒトおよびヤギ I 型コラーゲン, ウサギ血清抗ウシ IV 型コラーゲンを 300 倍に, ウサギ血清抗ヒトフィブロネクチン抗体を 2,000 倍に, ウサギ血清抗マウスラミニン抗体を 1,000 倍に, それぞれ BSA-PBS を用いて希釈) を切片に添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で十分に洗浄した後、希釈した二次抗体 (FITC 標識ヤギ IgG 抗ウサギ IgG 抗体を BSA-PBS で 500 倍に希釈) を切片に添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で十分に洗浄した後、PBS で 50% に希釈した無蛍光グリセリンで封入し、落射式蛍光位相差倒立顕微鏡 (Axioskop 50, Zeiss, Oberkochen, ドイツ) で観察してフジクローム Provia 400 を用いて写真撮影した。対照として、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清 (300 倍に BSA-PBS で希釈) を用いて同様の観察を行ったが、有意な蛍光は観察されなかった。また、摘出した対側の眼球を塩化セチルピリジニウム-ホルマン固定、脱水、パラフィン透徹後、パラフィンに包埋し、滑走式 microtome (HistoSlide 2000, Reichert-Jung 社製) を用いて厚さ 4 μm のパラフィン切

片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的観察も行い、光学顕微鏡 (Axioskope 50, Zeiss, Oberkochen, ドイツ) により観察し、フジクローム Provia 400 を用いて写真撮影した。

III 結 果

1. 病理組織学的検討 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

Ho: YAG laser 照射 1 日後のヘマトキシリン・エオジン染色した角膜上皮の所見は、検討した 3 眼で若干の差異があった。照射した 3 眼のうち、1 眼では照射部上皮に強い浮腫および上皮細胞間の水疱形成と上皮細胞の多層化が観察された。しかしながら、他の 2 眼については、照射中心部で上皮障害を推定する所見はなく、正常ラット角膜 (図 1 A) とほぼ同様な構造であった。検討したすべての角膜実質ではコラーゲン線維間の間隙が拡大し、整然とした連続性のあるコラーゲン線維の走行性が消失して乱れが観察された。このことは、角膜実質が収縮し全層にわたって熱凝固されていることを推定している。照射部に相当する角膜実質では、角膜実質細胞が消失した無細胞域となっている所見が 3 眼中 2 眼において観察された。他の 1 眼は照射部の角膜実質に僅かに細胞が観察された。観察したすべての 3 眼の角膜において retrocorneal membrane が観察された (図 1 B)。

照射 3 日後では、検討した 4 眼のうち 1 眼において照射 1 日後と同様な上皮の水疱形成と多層化が観察されたが、他の 3 眼では角膜上皮には何らの異常所見がなかった。照射した 4 眼すべてに、照射部に相当する部位の角膜実質が収縮しており、照射 1 日目に観察された無細胞域には障害部周辺から角膜実質細胞が遊走してきているのが観察された。Retrocorneal membrane は 4 眼中 2 眼に観察された (図 1 C)。

照射 1 週間後では、3 眼すべてに実質が収縮し、照射部に相当する角膜実質には多数の角膜実質細胞が集簇してきており、組織の再構築が行われていると考えられた。3 眼中 1 眼にのみ、retrocorneal membrane が観察された (図 1 D)。

2. 細胞外マトリックスの局在変化

各種細胞外マトリックスの抗体を用いた蛍光抗体法により、照射後の細胞外マトリックスの局在変化を検討した。

Ho: YAG laser 照射を行っていない正常角膜では、I 型コラーゲンに対する特異蛍光は角膜実質全層に強く観察された (図 2 A)。Ho: YAG laser 照射により、コラーゲン線維層の離間があったが、I 型コラーゲンに対する特異蛍光は角膜実質全層にあった。照射した角膜実質の収縮した部位で僅かに強い染色があったが、今回検討した照射 1, 3 日および 1 週間後のいずれの観察日においても、照射前後で I 型コラーゲンの局在はほとんど変化はなかった (図 2 B~D)。

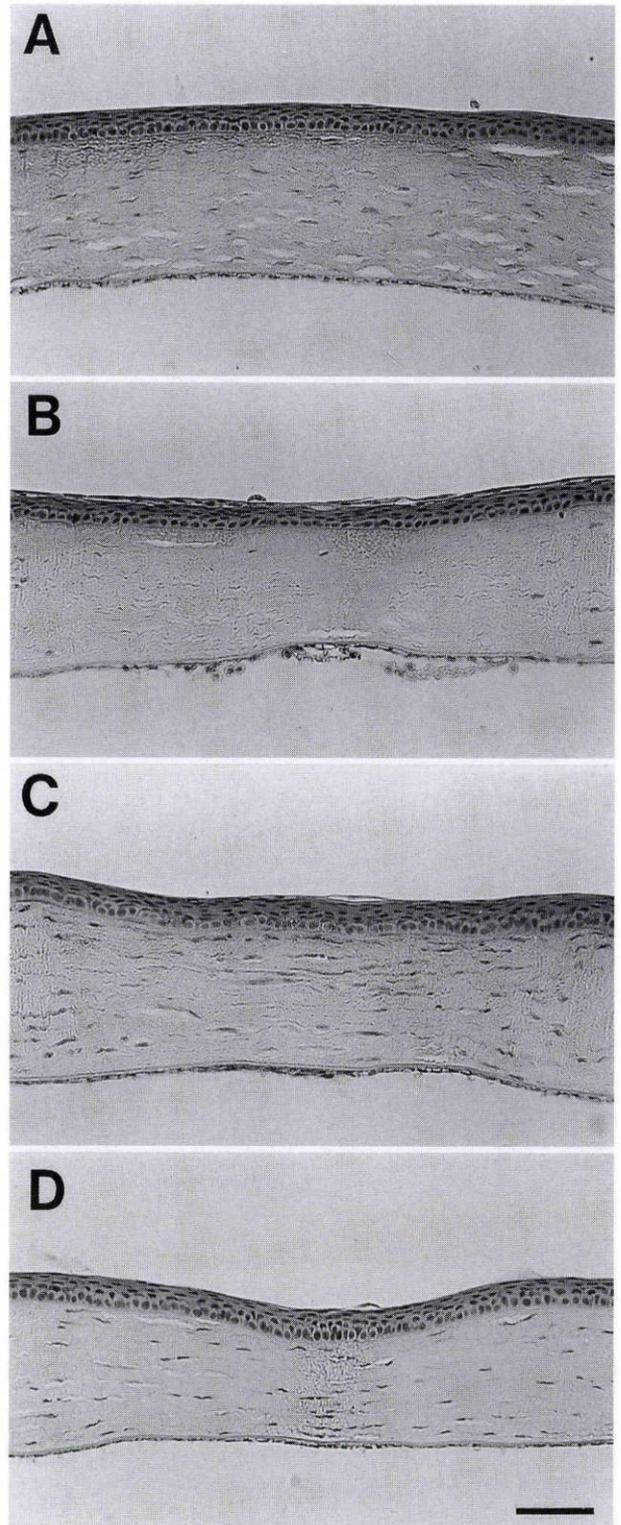


図 1 正常角膜とホルミウムヤグレーザー (Ho: YAG laser) 照射後のラット角膜のヘマトキシリン・エオジン染色。

A: 正常角膜。照射 1 日後 (B), 照射中心部で上皮障害はなかった。角膜実質のコラーゲン線維が全層にわたって収縮していた。照射部の角膜実質細胞は消失して無細胞域となっていた。照射 3 日後 (C), 角膜実質の収縮があり、無細胞域に角膜実質細胞が浸潤していた。照射 1 週間後 (D), 実質の収縮があり、無細胞域には多数の角膜実質細胞が集簇していた。バーは 100 μm

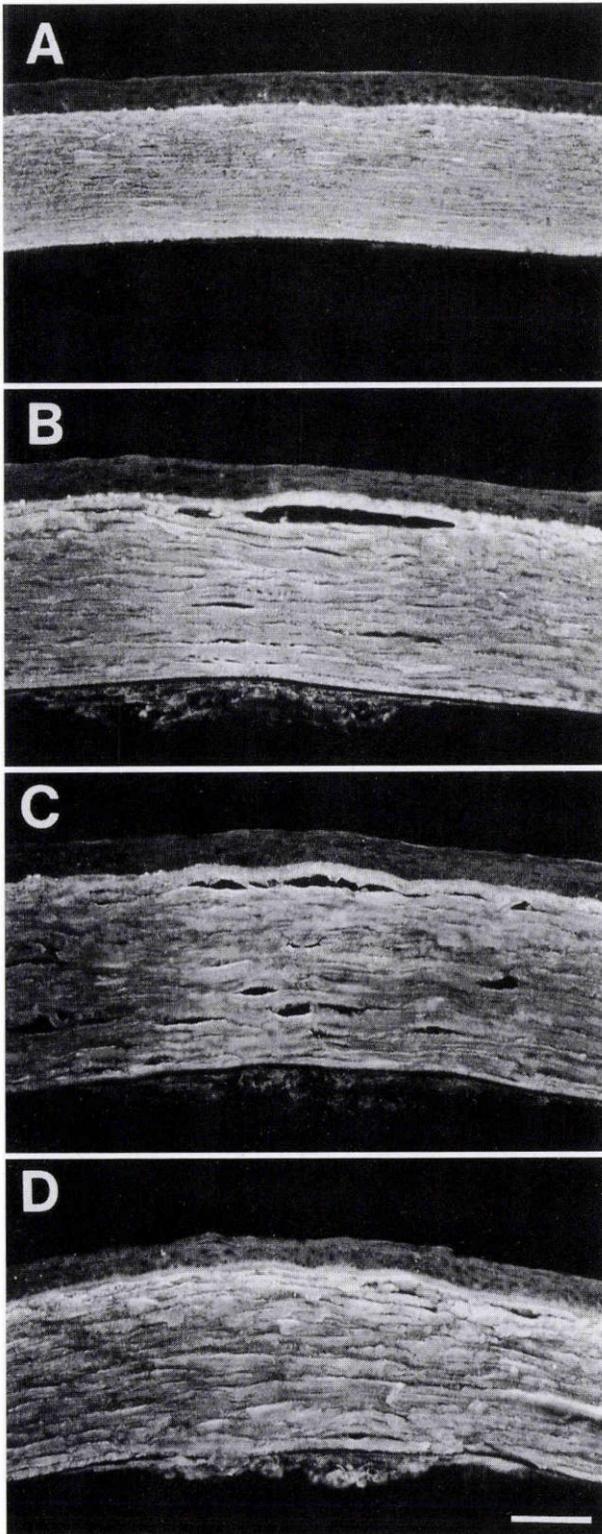


図2 正常角膜と Ho:YAG laser 照射後のラット角膜における I 型コラーゲンの局在.

正常角膜では I 型コラーゲンに対する特異蛍光は角膜実質全層に強く観察された(A). Ho:YAG laser 照射によりコラーゲン線維層の離開があったが,特異蛍光は角膜実質全層にあり,照射 1(B),3 日(C),1 週間後(D)のいずれの観察日においても照射前後で局在に変化はなかった. バーは 100 μm

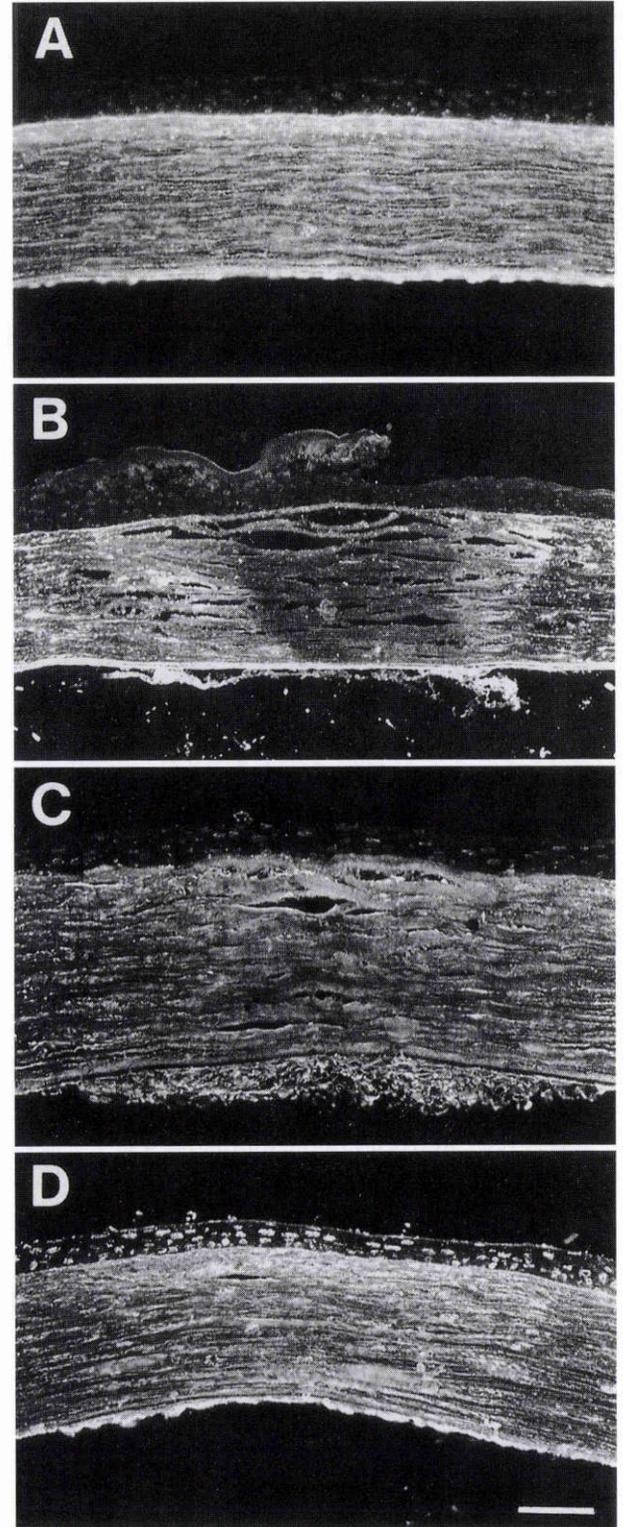


図3 正常角膜と Ho:YAG laser 照射後のラット角膜におけるフィブロンectin の局在.

正常角膜ではフィブロンectin に対する特異蛍光は角膜実質,上皮基底膜およびデスメ膜に観察された(A).照射 1 日後(B),実質の無細胞域では蛍光は消失したが,照射 3 日(C),1 週間後(D)では,無細胞域の周辺部からの浸潤してくる角膜実質細胞に一致して強い特異蛍光が観察された. Retrocorneal membrane にも特異蛍光が観察された. バーは 100 μm

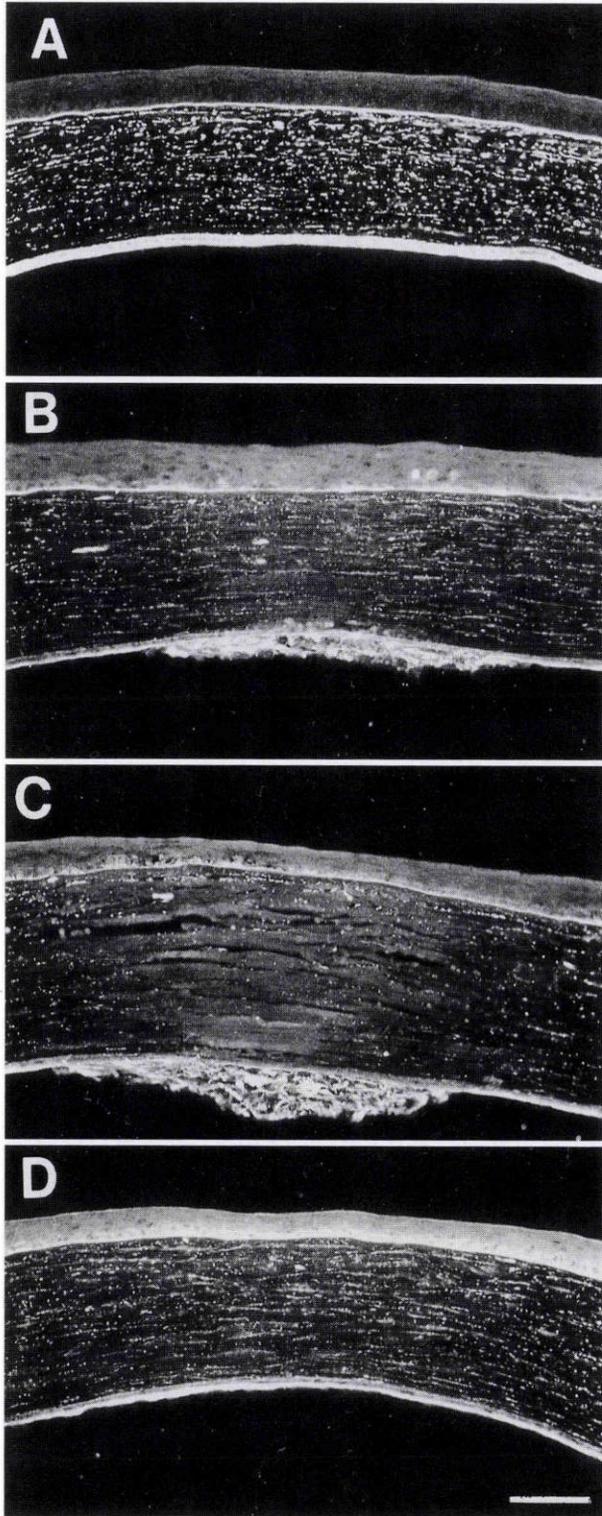


図4 正常角膜と Ho: YAG laser 照射後のラット角膜における IV 型コラーゲンの局在.

IV 型コラーゲンに対する特異蛍光は, 照射していない正常角膜 (A) と同様に照射 1 (B), 3 日 (C) および 1 週間後 (D) も上皮基底膜部およびデスメ膜に観察された. Retrocorneal membrane にも特異蛍光が観察された. バーは 100 μ m

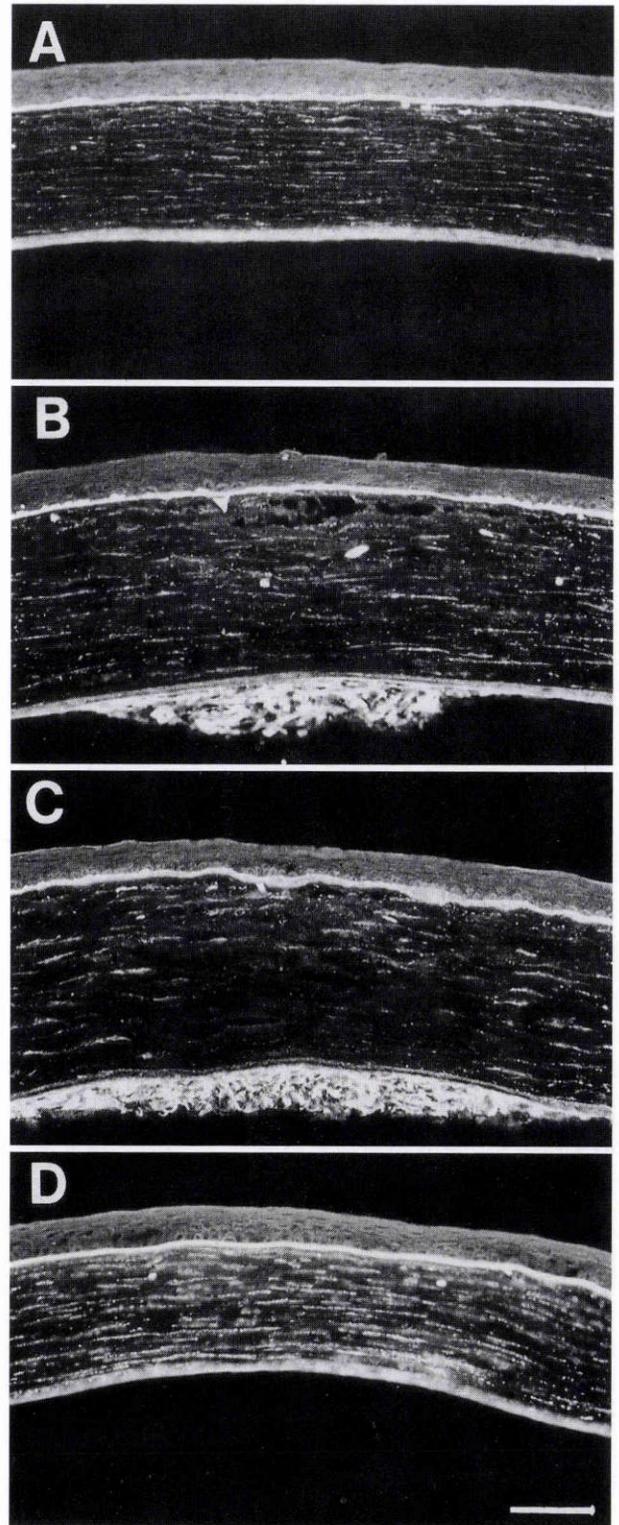


図5 正常角膜と Ho: YAG laser 照射後のラット角膜におけるラミニンの局在.

ラミニンに対する特異蛍光は, 照射していない正常角膜 (A) と同様に照射 1 (B), 3 日 (C) および 1 週間後 (D) も上皮基底膜部およびデスメ膜に観察された. Retrocorneal membrane にも特異蛍光が観察された. バーは 100 μ m

正常角膜のフィブロネクチンに対する特異蛍光は, 角膜実質, 上皮基底膜およびデスメ膜に観察された (図 3

A). 照射 1 日後の角膜では, 角膜実質のフィブロネクチンに対する蛍光は減弱し, 特に照射部位の相当する角膜

実質ではほとんどなかった(図3B)。照射3日後では、角膜実質のフィブロネクチンに対する蛍光は無細胞域への角膜実質細胞の遊走に一致して特異蛍光が観察された(図3C)。照射1週間後では、照射部位の角膜実質細胞の集簇部に一致して強い特異蛍光が観察された(図3D)。Retrocorneal membraneにはフィブロネクチンに対する特異蛍光が観察された。

基底膜成分であるIV型コラーゲン(図4)およびラミニン(図5)に対する特異蛍光は、照射していない正常角膜(図4A, 5A)と同様に照射1(図4B, 5B), 3日(図4C, 5C)および1週間(図4D, 5D)後も上皮基底膜部およびデスメ膜に観察され、Ho: YAG laser 照射によりIV型コラーゲンおよびラミニンの局在に変化はなかった。Retrocorneal membraneにはIV型コラーゲンおよびラミニンに対する特異蛍光が観察された。

IV 考 按

Ho: YAG laser 照射による屈折矯正手術の術後成績を考える場合、角膜の形状の変化に関連する実質コラーゲンの状態と照射後の合併症である創傷治癒遅延などが重要な問題点である。本研究では組織学的な検討に加え、蛍光抗体法を用いて実質を構成するI型コラーゲンの状態、侵襲に反応して出現し創傷治癒過程に重要な役割を演じるフィブロネクチンおよび角膜上皮の恒常性維持や創傷治癒に参与する基底膜成分であるIV型コラーゲンおよびラミニンについて、その局在の変化を検討した。

角膜実質のコラーゲン線維はある一定の熱を加えると約1/3に収縮することが知られており、角膜熱形成術はこのコラーゲン線維の熱による収縮反応を利用して角膜の形状を変化させるものである⁶⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。今回の研究でもラットの角膜実質はHo: YAG laserの熱エネルギーにより、照射部の実質は収縮していることが組織学的に確認でき、この結果はすでにヒトやウサギで報告されている病理組織学的変化と非常によく一致していた^{18)~21)}。また、角膜実質の主たる細胞外マトリックス成分であるI型コラーゲンは線維層間の解離があるものの、実質の融解などの潰瘍の出現を伺わせるような角膜所見はなかった。

角膜に障害が加わった場合、その創傷治癒過程では活性化した角膜実質細胞が重要な役割を果たしている¹⁵⁾²²⁾²³⁾。Ho: YAG laser 照射により、照射部位の角膜実質細胞は1日後にはいったん消失し、実質層には無細胞域が形成された。その後、徐々に活性化した角膜実質細胞が無細胞域に浸潤してきており、1週間後には照射部位の上皮下に集簇して観察され、積極的に角膜実質の創傷治癒反応が進んでいると考えられた。

角膜に種々の侵襲が加わった直後には、障害部の角膜実質細胞は障害に反応してアポトーシスが誘導されて実質層に無細胞域を形成することが報告^{24)~26)}されている。

今回のHo: YAG laser 照射による角膜実質の無細胞域形成には角膜実質細胞のアポトーシスによるものか、単に熱障害によるものかは明らかにできなかったが、角膜上皮に刺激が加わるのみで角膜実質細胞のアポトーシスが誘導されることから、Ho: YAG laser 照射では両者が関与していると考えられる。

照射後のフィブロネクチンの局在変化を観察すると、照射により実質のフィブロネクチンはいったん消失するものの、照射3日後から無細胞域周辺でフィブロネクチンの蛍光が強く観察された。これは、無細胞域に浸潤しはじめている活性化した角膜実質細胞によるフィブロネクチンの合成が亢進している状態と考えられた。この結果は、我々が以前にサーマルチップを用いてウサギ角膜を熱凝固した時のフィブロネクチンの局在変化とよく一致していた²⁷⁾。このようなフィブロネクチンの局在変化は、角膜実質への切開創を作製した場合にも同様に観察され¹⁴⁾²⁸⁾、一般的な角膜実質への侵襲に対する生体防御反応の一つとして、活性化した角膜実質細胞によるフィブロネクチンの合成が角膜実質の創傷治癒に参与しているものと考えられる。

一方、角膜上皮の構造の維持や欠損後の創傷治癒に重要な役割を演じる上皮基底膜成分であるラミニンとIV型コラーゲンの局在については、照射前後を通じて変化はなく、熱凝固を行ったにも拘わらずほとんど無傷であった。このことは、本研究に用いたHo: YAG laser 装置がslit-lamp delivery systemを備えており、照射による熱エネルギーが角膜実質に到達し上皮および上皮下の基底膜には焦点が合わず、比較的これらの部位への傷害が少ないものと考えられた。しかしながら、Koch²¹⁾の報告ではウサギにHo: YAG laser 照射した直後には、基底膜成分であるIV型コラーゲン、ヘミデスモゾーム成分であるインテグリン $\beta 4$ およびアンカーリングフィブリル成分であるVII型コラーゲンの消失が観察され、その修復には約3か月を要することから、Ho: YAG laser 照射の創傷治癒過程は上皮剝離、角膜切開やエキシマレーザー照射と同様であると報告している。これらの結果の差異については照射条件の違いによるものと考えられる。すなわち、今回の我々の照射条件では照射により角膜上皮剝離はなかったが、Koch²¹⁾の照射条件では照射部に一致して角膜上皮剝離があった。したがって、照射条件の違いで角膜上皮剝離が生じるような条件下では、上皮基底膜まで障害されて基底膜の再形成まで時間を要するものと考えられた。

今回、Ho: YAG laser 照射したラットの半数以上で角膜内皮にretrocorneal membraneが観察された。Koch²¹⁾やMoreiraら¹⁸⁾の報告でもウサギに照射した後の角膜内皮にretrocorneal membraneが観察されたと報告している。これらは、実験に用いた動物に対して照射条件が強すぎたことが原因であると考えられる。ヒト角膜に比

し、実験に用いた動物の角膜厚は薄く(ラット:約 150~200 μm , ウサギ:約 350 μm), 照射による熱エネルギーが角膜内皮側にまで及んでいると考えられる。実際, 我々の検討でも Ho: YAG laser 照射直後の slit-lamp 検査による前眼部の観察では, 実質の混濁はヒトや大動物(ウシ, プタ)の角膜で報告²⁰⁾²⁹⁾³⁰⁾されているような wedge-shaped area ではなく, 長方形で広範囲に, かつ内皮まで角膜全層に観察されたことから, 角膜を越えて深く熱エネルギーが到達していると考えられる。したがって, 角膜内皮に対する Ho: YAG laser の傷害性は光学的な焦点に依存することであり, ラットやウサギなどでの成績をそのままヒトに外挿することはできない。

今回報告したように, Ho: YAG laser 照射による熱エネルギーは, 角膜実質のコラーゲン線維の収縮に有効であり, 他の熱凝固の方法でみられたような無菌性の壊死や実質の融解⁹⁾³¹⁾を生じるほど実質に対して侵襲は強くないと考えられ, 実際臨床で報告^{13)32)~34)}されているように安全性にはそれほど問題がないと考えられた。また今回の結果, 照射による上皮細胞や上皮基底膜への侵襲は比較的少なく, Ho: YAG laser 照射により屈折矯正手術を行った際, 一時的に上皮浮腫のような角膜上皮障害が生じるものの, 上皮基底膜が無傷であることから上皮修復は速やかであり, 遷延性角膜上皮欠損などの上皮創傷治癒遅延は生じにくいと推察された。今後, さらに長期的な組織学的変化および屈折力の戻りとの相関についても検討する必要がある。

稿を終えるに当たり, 本論文作成にご協力いただいた山口大学医学部眼科学教室の末富美千代氏に感謝いたします。

文 献

- 1) **Binder PS**: Radial keratotomy and excimer laser photorefractive keratectomy for the correction of myopia. *Refract Corneal Surg* 10: 443—464, 1994.
- 2) **Waring GO III, 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.
- 3) **Seiler T, McDonnell PJ**: Excimer laser photorefractive keratectomy. *Surv Ophthalmol* 40: 89—118, 1995.
- 4) **Lans LJ**: Experimentell Untersuchungen über Entstehung von Astigmatismus durch Nicht-Perforierende Corneawunden. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 45: 117—152, 1898.
- 5) **Terrien F**: Dystrophie marginale symétrique des deux cornées avec astigmatisme régulier consécutif et guérison par la cautérisation ignée. *Arch Ophthalmol* 20: 12—21, 1900.
- 6) **Gasset AR, Shaw EL, Kaufman HE, Itoi M, Sakimoto T, Ishii Y**: Thermokeratoplasty. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 77: 441—454, 1973.
- 7) **Gasset AR, Kaufman HE**: Thermokeratoplasty in the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 79: 226—232, 1975.
- 8) **Neumann AC, Fyodorov S, Sanders DR**: Radial thermokeratoplasty for the correction of hyperopia. *Refract Corneal Surg* 6: 404—412, 1990.
- 9) **Aquavella JV, Smith RS, Shaw EL**: Alterations in corneal morphology following thermokeratoplasty. *Arch Ophthalmol* 94: 2082—2085, 1976.
- 10) **Feldman ST, Ellis W, Frucht-Pery J, Chayet A, Brown SI**: Regression of effect following radial thermokeratoplasty in humans. *Refract Corneal Surg* 5: 288—291, 1989.
- 11) **Durrie DS, Schumer DJ, Cavanaugh TB**: Holmium: YAG laser thermokeratoplasty for hyperopia. *Refract Corneal Surg* 10: S 277—280, 1994.
- 12) **Koch DD, Kohnen T, McDonnell PJ, Menefee RF, Berry MJ**: Hyperopia correction by noncontact holmium: YAG laser thermal keratoplasty. United States phase IIA clinical study with a 1-year follow-up. *Ophthalmology* 103: 1525—1536, 1996.
- 13) **Koch DD, Kohnen T, McDonnell PJ, Menefee RF, Berry MJ**: Hyperopia correction by noncontact holmium: YAG laser thermal keratoplasty: U. S. phase IIA clinical study with 2-year follow-up. *Ophthalmology* 104: 1938—1947, 1997.
- 14) **Murakami J, Nishida T, Otori T**: Coordinated appearance of β_1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 120: 86—93, 1992.
- 15) **Nishida T, Tanaka T**: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 7: 2—11, 1996.
- 16) **Stringer H, Parr J**: Shrinkage temperature of eye collagen. *Nature* 204: 1307, 1964.
- 17) **Shaw EL, Gasset AR**: Thermokeratoplasty (TKP) temperature profile. *Invest Ophthalmol* 13: 181—186, 1974.
- 18) **Moreira H, Campos M, Sawusch MR, McDonnell JM, Sand B, McDonnell PJ**: Holmium laser thermokeratoplasty. *Ophthalmology* 100: 752—761, 1993.
- 19) **Ren Q, Simon G, Parel J-M**: Noncontact laser photothermal keratoplasty. III. Histological study in animal eyes. *Refract Corneal Surg* 10: 529—539, 1994.
- 20) **Smithpeter C, Chan E, Thomsen S, Rylander HG III, Welch AJ**: Corneal photocoagulation with continuous wave and pulsed holmium: YAG radiation. *J Cataract Refract Surg* 21: 258—267, 1995.
- 21) **Koch DD**: Histological changes and wound healing response following noncontact holmium: YAG laser thermal keratoplasty. *Trans Am Ophthalmol*

- Soc 94: 745—802, 1996.
- 22) **Binder PS, Wickham MG, Zavala EY, Akers PH**: Corneal anatomy and wound healing. In: Barraquer JJ, et al (Eds): Symposium on Medical and Surgical Diseases of the Cornea. CV Mosby, St Louis, 1—35, 1980.
 - 23) **Nishida T**: Biology of corneal stromal keratocytes. In: Kinoshita S, et al (Eds): Current Opinions in the Kyoto Cornea Club. Kugler Publications, Amsterdam, 43—49, 1997.
 - 24) **Gao J, Gelber-Schwalb TA, Addeo JV, Stern ME**: Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Cornea* 16: 200—208, 1997.
 - 25) **Wilson SE**: Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: Programmed cell death and wound healing. *Refract Corneal Surg* 13: 171—175, 1997.
 - 26) **Helena MC, Baerveldt F, Kim W-J, Wilson SE**: Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 276—283, 1998.
 - 27) **Ohashi Y, Nakagawa S, Nishida T, Suda T, Watanabe K, Manabe R**: Appearance of fibronectin in rabbit cornea after thermal burn. *Jpn J Ophthalmol* 27: 547—555, 1983.
 - 28) **Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R**: Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr Eye Res* 1: 553—556, 1981.
 - 29) **Simon G, Ren Q, Parel JM**: Noncontact laser photothermal keratoplasty. II. Refractive effects and treatment parameters in cadaver eyes. *Refract Corneal Surg* 10: 519—528, 1994.
 - 30) **Asiyo-Vogel MN, Brinkmann R, Notbohm H, Eggers R, Lubatschowski H, Laqua H, et al**: Histologic analysis of thermal effects of laser thermokeratoplasty and corneal ablation using Sirius-red polarization microscopy. *J Cataract Refract Surg* 23: 515—526, 1997.
 - 31) **Fogle JA, Kenyon KR, Stark WJ**: Damage to epithelial basement membrane by thermokeratoplasty. *Am J Ophthalmol* 83: 392—401, 1977.
 - 32) **Koch DD, Abarca A, Villarreal R, Menefee R, Kohnen T, Vassiliadis A, et al**: Hyperopia correction by noncontact holmium: YAG laser thermal keratoplasty. Clinical study with two-year follow-up. *Ophthalmology* 103: 731—740, 1996.
 - 33) **Alió JL, Ismail MM, Artola A, Pérez Santonja JJ**: Correction of hyperopia induced by photorefractive keratectomy using non-contact Ho: YAG laser thermal keratoplasty. *Refract Corneal Surg* 13: 13—16, 1997.
 - 34) **Kohnen T, Koch DD, McDonnell PJ, Menefee RF, Berry MJ**: Noncontact holmium: YAG laser thermal keratoplasty to correct hyperopia: 18-month follow-up. *Ophthalmologica* 211: 274—282, 1997.