

エキシマレーザー表層切除家兎角膜の創傷治癒に関する長期観察

中安 清夫, 渡部 保男, 後藤 淑子, 加藤 卓次, 石川 隆, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

目 的: エキシマレーザーで表層切除術を行った家兎角膜の長期的な変化を, 組織学的・免疫組織化学的に検索する。

対象と方法: 家兎 6 匹 12 眼に対し, エキシマレーザー角膜表層切除術を行った。その 2 年と 3 年後に角膜を組織学的・免疫組織化学的に検索した。

結 果: どちらの時点でも, 角膜の上皮基底膜の一部に凹凸不正化と上皮側へのスパイク状の侵入があった。上皮直下の実質浅層コラーゲン線維に走行の乱れがあった。免疫組織化学的に, 抗 III 型コラーゲン抗体の陽性所見が, 表層切除部の上皮下の実質浅層にあった。抗 IV 型コラーゲン抗体は上皮基底膜の他, 中央部実質浅層にも

陽性所見を呈した。これら角膜実質浅層の III 型と IV 型コラーゲンに対する陽性所見は, 瘢痕組織がまだ局在しているものと解釈された。アンカリングフィブリルである VII 型コラーゲンに対する抗体は, 切除部の基底膜上での染色性が弱く, 上皮接着装置の再生が不十分であることを示した。

結 論: エキシマレーザーで表層切除術を行った家兎角膜の創傷治癒は, 術後 3 年でも不完全であった。(日眼会誌 103: 99—107, 1999)

キーワード: エキシマレーザー, 角膜表層切除術, 創傷治癒, 長期観察, 家兎

Long-term Healing of Excimer Laser Ablated Rabbit Corneas

Kiyoo Nakayasu, Yasuo Watanabe, Toshiko Gotoh, Takuji Kato, Takashi Ishikawa and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose: To evaluate histologically and immunohistochemically long-term changes in rabbit cornea following excimer laser ablation.

Materials and Methods: Excimer laser keratectomy was performed on 12 eyes of 6 rabbits. The corneas were subjected to histological and immunohistochemical studies 2 and 3 years after treatment.

Findings: In all specimens, epithelial basement membrane of the ablated central cornea showed undulating and spike-pattern invasion into the epithelial side. The collagen lamellae showed irregularities in the subepithelial stroma. Immunohistochemically, the subepithelial stroma showed positive reaction to anti-type III collagen antibody. Staining for anti-IV collagen antibody showed a linear pattern in

the epithelial basement membrane and was positive in the subepithelial stroma of the ablated central cornea. These positive reactions to anti-type III and type IV collagen antibodies in the stroma showed the localized presence of scar tissue in the ablated stroma. Antibody to type VII collagen showed weak reaction in the basement membrane, suggesting incomplete regeneration of anchoring fibrils.

Conclusion: The healing process was still incomplete 3 years after excimer laser keratotomy in rabbits. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 99—107, 1999)

Key words: Excimer laser, Keratectomy, Wound healing, Long-term observation, Rabbit

I 緒 言

エキシマレーザーを用いた角膜表層切除術 (photorefractive keratectomy: PRK, phototherapeutic keratectomy: PTK) は, 既に数社の臨床治験が終了し, 本格的な

臨床応用の時代に入ろうとしている。しかしながら, 本術式に関連した種々の問題点, 副作用が指摘されており, 中には原因の明らかでないものやコントロール不可能な副作用などがある。例えば, レーザー照射による紫外線障害¹⁾, 上皮混濁の成因とその予防および治療法^{2)~4)},

別刷請求先: 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部眼科学教室 中安 清夫

(平成 10 年 1 月 14 日受付, 平成 10 年 8 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

(Received January 14, 1998 and accepted in revised form August 27, 1998)

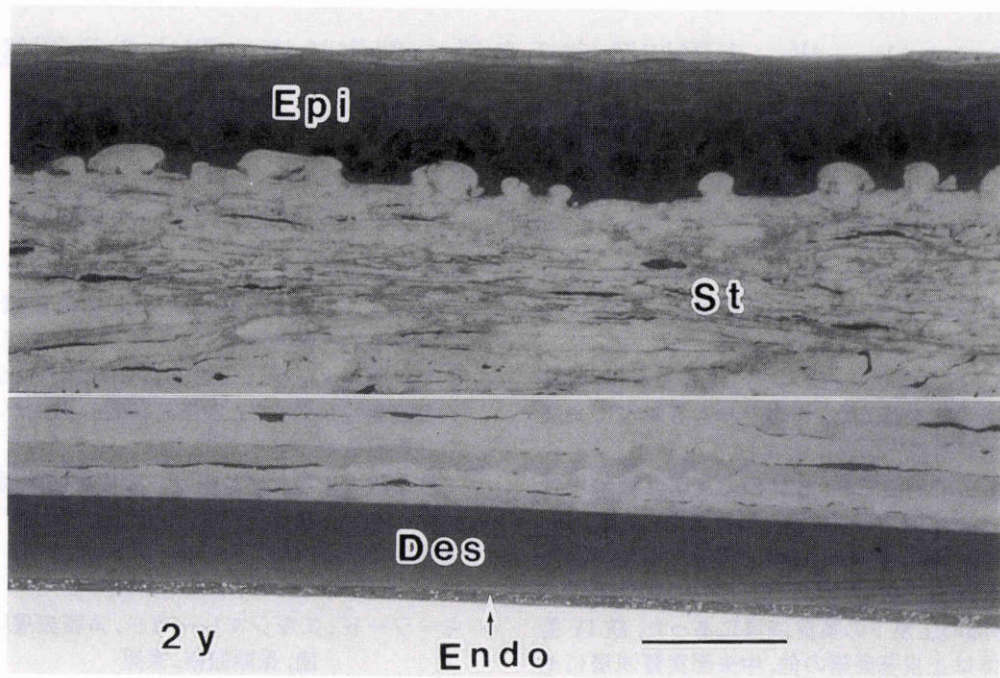


図1 エキシマレーザー表層切除後2年目の家兎角膜。
トルイジンブルー染色, Epi: 上皮細胞, St: 実質, Des: デスメ膜, Endo: 内皮細胞. バーは 50 μ m

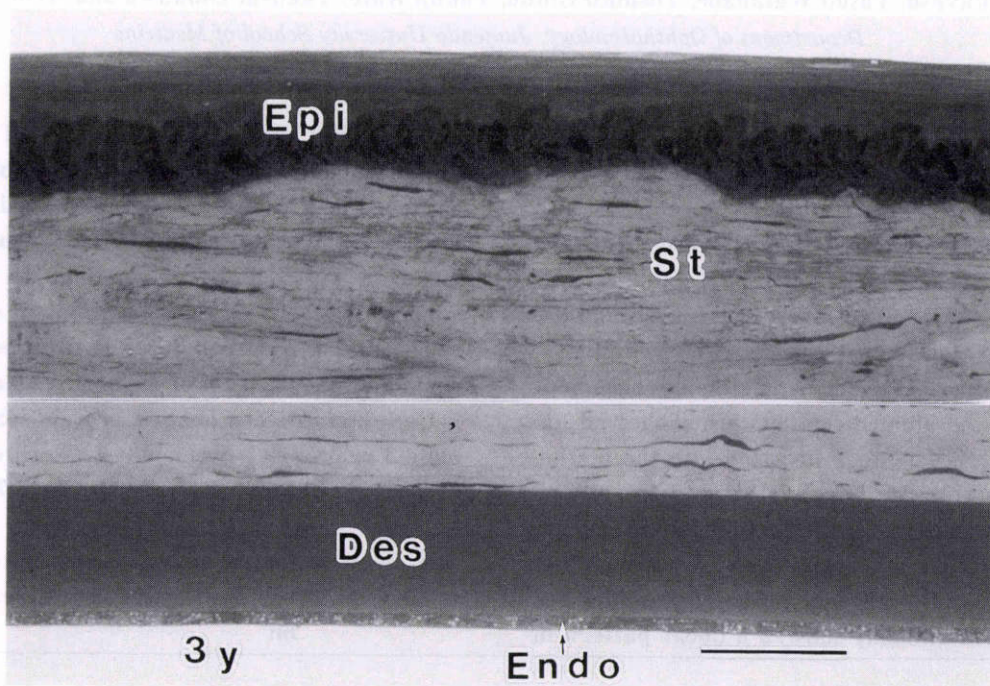


図2 エキシマレーザー表層切除後3年目の家兎角膜。
トルイジンブルー染色, Epi: 上皮細胞, St: 実質, Des: デスメ膜, Endo: 内皮細胞. バーは 50 μ m

PRK における矯正誤差や術後再近視化⁵⁾などが挙げられる。

これまで我々は、近視眼に対する PRK 後の屈折値の戻り (regression), すなわち、再近視化に表層切除部分の上皮下混濁 (subepithelial haze) が関与していることを指摘し、上皮下混濁の成因、本態に関する研究を進めてきた。その結果、上皮下混濁部分には、III 型と IV 型コラー

ゲン線維およびコンドロイチン硫酸を主な糖鎖とする分子量の大きなラージプロテオグリカンが含まれており、これらの細胞間物質が上皮下混濁の本態であることを指摘した⁶⁾⁷⁾。さらに、この上皮下混濁はエキシマレーザーを用いない従来の方法で施行した表層角膜切除後においても出現することから、エキシマレーザー照射自体が原因ではなく、角膜実質損傷時の創傷治癒過程で観察され

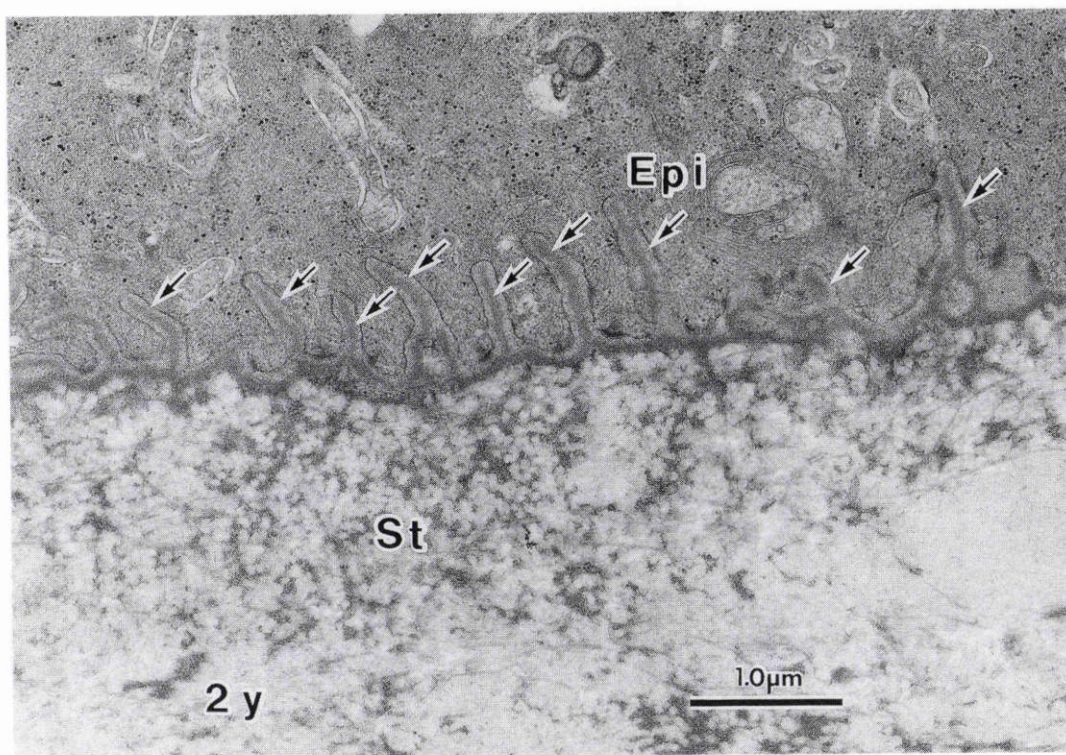


図 3 術後 2 年目の上皮基底膜付近.

Epi: 上皮細胞, St: 実質, 矢印: 上皮側にスパイク状に突出した基底膜, バーは 1.0 μm

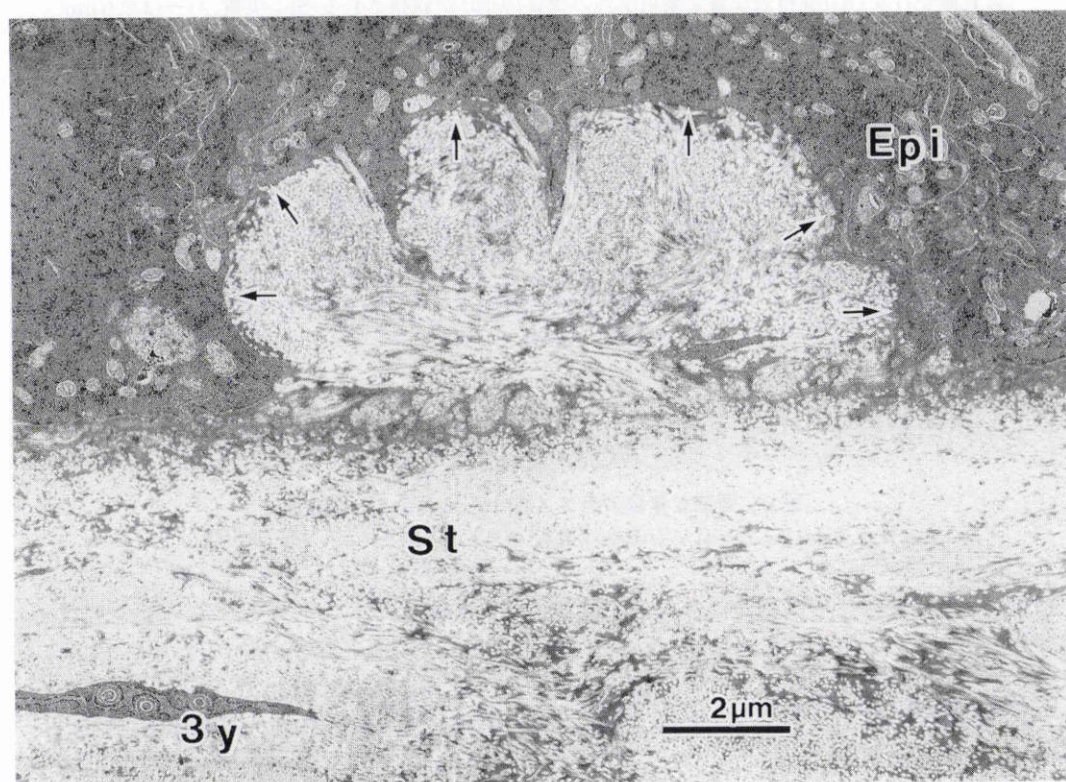


図 4 術後 3 年目の上皮基底膜付近.

Epi: 上皮細胞, St: 実質, 矢印: カリフラワー状に突出した基底膜, この領域にはハーフデスモゾームが極めて少ない, バーは 2.0 μm

るごく一般的な癒痕組織であろうと報告⁶⁾した. しかし, この上皮下混濁を含めたエキシマレーザー表層角膜切除後の創傷治癒がどのような長期的経過をたどるのかは未

だに不明のままである.

今回我々は, 本術式の術後長期経過を組織学的に検討する目的で, 家兎角膜にエキシマレーザーを照射し角膜

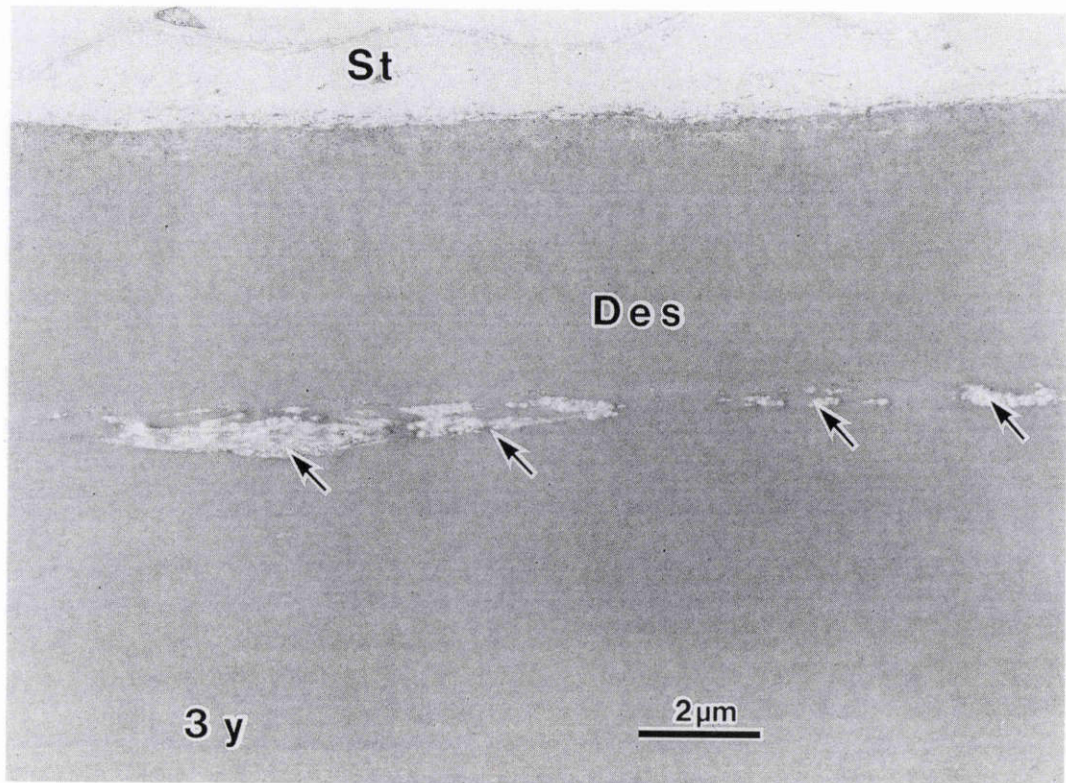


図5 術後3年目のデスメ膜(Des).
実質側から5~6 μ m付近に電子染色陰性の物質(矢印)が観察される.St:実質,バーは2.0 μ m

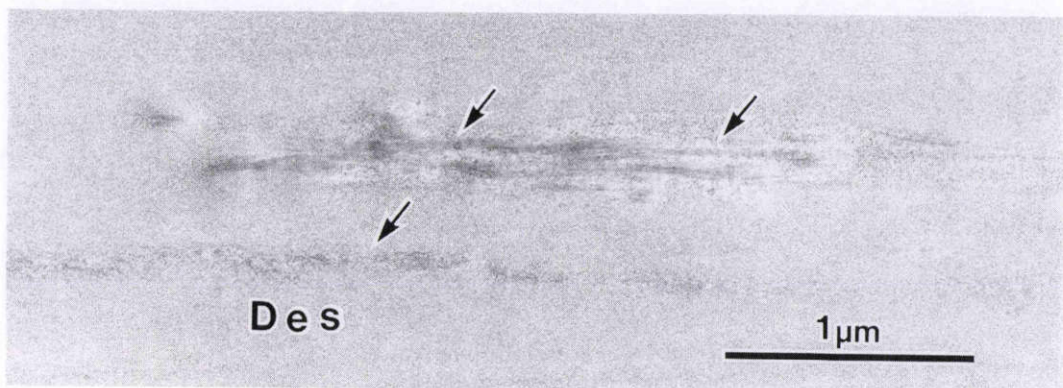


図6 術後3年目のデスメ膜(Des). タンニン酸染色.
横走するバンドを有する線維性物質(矢印)が観察される.バーは1.0 μ m

表層切除を施行し,術後3年目まで組織学的または免疫組織化学的に観察し,若干の知見を得たので報告する.

II 対象および方法

1. エキシマレーザー角膜表層切除術

実験には,体重2.5~3.0 kg(13~17週齢)の白色家兎(雌)6匹12眼を使用した.エキシマレーザーによる角膜表層切除には,ニデック社製EC-5000を使用した.白色家兎をキシラジン塩酸塩(セラクタル®)添加塩酸ケタミン(ケタラル®)の筋肉内注射による全身麻酔および0.4%塩酸オキシプロカイン(ベノキシール®)による点眼麻酔をした後,角膜表面の水分をMQA®で可能な限

り吸収除去した.エキシマレーザーの設定はPTKモードとし,術前の上皮剥離は行わなかった.切除領域は直径5 mm,切除深度は100 μ m,レーザーパルスエネルギーは130 mJ/pulse,繰り返し周波数は30 Hzとして角膜表層切除を施行した.術後オフロキサシン眼軟膏を点入し,その後5日間オフロキサシン点眼薬を1日3回投与した.その際,術後角膜感染症や上皮再被覆遅延のないことを,肉眼的あるいはフルオセイン染色で確認した.また,術後3~6週目の間にすべての表層切除角膜に上皮下混濁が出現していることを確認した.家兎は,通常の動物舎の家兎用ケージ内で飼育し,術後2年および3年目に,各々3匹6眼について細隙灯顕微鏡を用いた徹照法で,角膜中

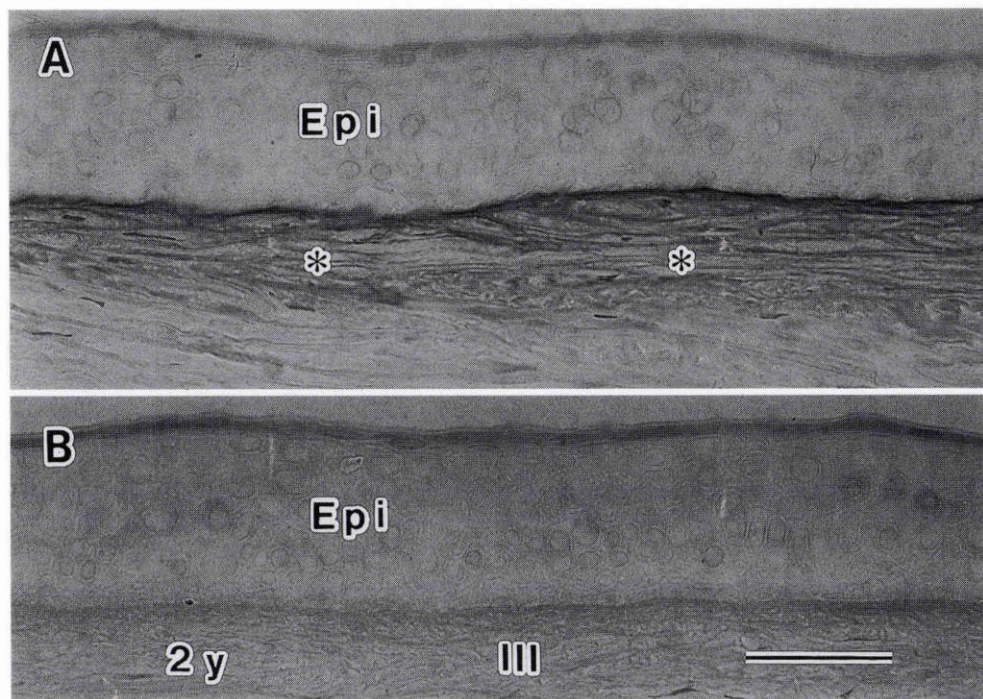


図 7 術後 2 年目. 抗 III 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織標本.

A: 中央部角膜. 上皮直下の実質浅層が陽性を示す(*).

B: 周辺部角膜. この部分の実質は染色されない. バーは 50 μ m

中央部に円形の表層切除の痕跡を確認した後、ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の致死量静脈注射によって屠殺し、眼球を摘出した。

2. 組織学的検討

エキシマレーザー表層角膜切除を施行した角膜の一部は、2% グルタルアルデヒド液で固定した後、角膜片として通常の方法でアルコール脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。また、残りの眼球は無固定のまま角膜を切り出し、OCT compound (TISSUE-TEK®, マイルズ社) に包埋して凍結切片用とした。エポキシ樹脂に包埋した角膜片は、薄切してトルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡で観察した。また、さらに超薄切片を作製して、酢酸ウランおよびクエン酸鉛による通常の電子染色またはタンニン酸で染色した後、電子顕微鏡による観察に供した。OCT compound に包埋した角膜片からは、厚さ約 5 μ m の凍結切片を作製し、免疫組織化学的検索を試みた。一次抗体として、抗 III 型、抗 IV 型、抗 VII 型(いずれもサザンバイオテクノロジー社)の各型コラーゲン線維に対する抗体を用いて、アビジン・ビオチン法で反応させた後、ジアミノベンチジンで発色させて光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

エキシマレーザーによる表層切除後 2 および 3 年目の角膜(各々 2 匹 4 眼)を光学顕微鏡を用いて観察すると(図 1, 2), 上皮細胞は 4~5 層の細胞で被覆されており、ほぼ正常の厚さを保っていた。しかし、基底細胞の形状は

やや不整で、トルイジンブルーに対する染色性が正常のそれと比較してやや強い細胞が観察された。また、一部の上皮基底膜は 2, 3 年経過しても、凹凸不正であった。上皮下混濁があったと思われる角膜中央部の上皮直下の実質浅層には、ほぼ正常密度の実質細胞が局在していたが、トルイジンブルーで染色される細胞断片様の物質もあった。また、コラーゲン線維の走行にも軽度の乱れが観察された。術後 2, 3 年目の内皮細胞は光学顕微鏡による観察では特に異常はなかった。また、デスメ膜も 2 年目で厚さ約 28.5 μ m (4 眼の平均)であったが、3 年目になると約 41.5 μ m (4 眼の平均)と厚さを増していたものの、通常に加齢変化の範囲内と考えられた。その他、特に異常は観察されなかった。

電子顕微鏡を用いた観察では、術後 2, 3 年目のいずれの角膜にも一部に上皮基底膜の凹凸不正が観察された(図 3, 4)。中には、基底膜が上皮基底細胞内にスパイク状(図 3)に、また、カリフラワー状(図 4)に入り込んでいる部分も観察された。このような部分では、上皮・実質間の接着装置であるハーフデスモゾームの数が減少していた。術後 3 年目の角膜中央部のデスメ膜には、実質側から約 5~6 μ m 付近に水平に走る電子染色陰性の物質が観察された(図 5)。この物質をタンニン酸で染色すると、横走するバンドを持った比較的太いコラーゲン様の線維として観察された(図 6)。

抗 III 型コラーゲン抗体を一次抗体として用いて、術後 2 年目の角膜を観察すると、表層切除部分すなわち角膜中央部の上皮下混濁のあったと思われる領域に一致し

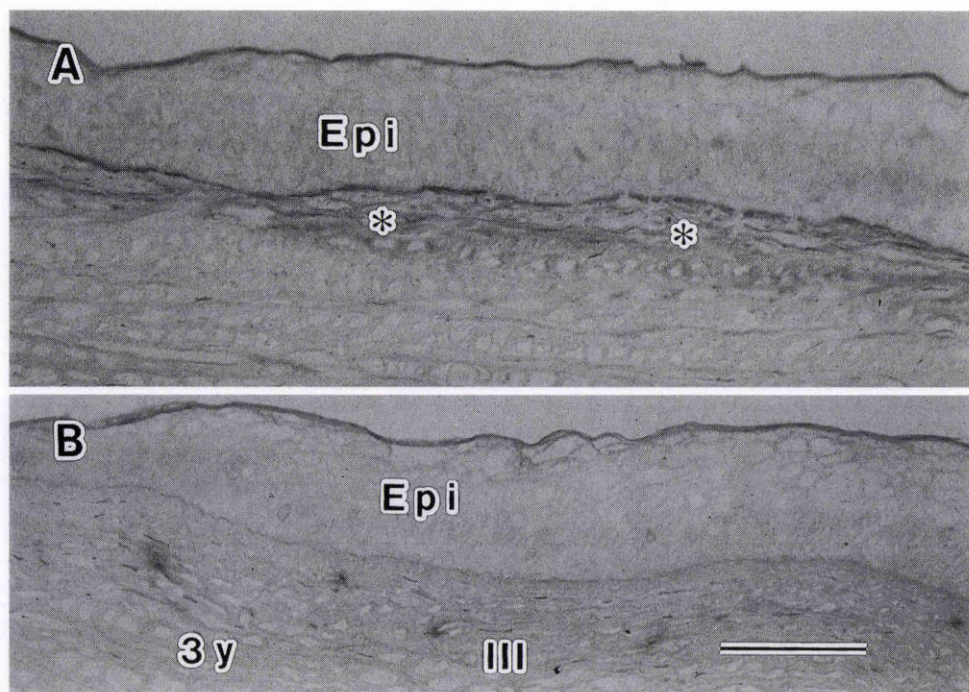


図8 術後3年目. 抗III型コラーゲン抗体を用いた免疫組織標本.

A: 中央部角膜. 上皮直下にわずかな陽性所見を示す(*).

B: 周辺部角膜. 陽性所見は観察されない. バーは50 μ m

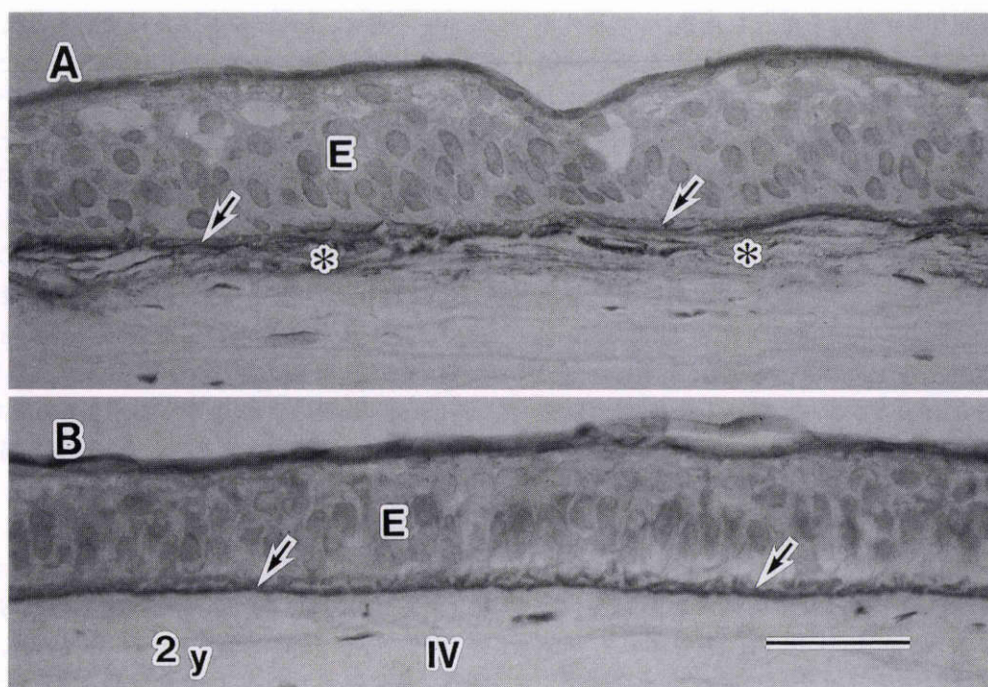


図9 術後2年目. 抗IV型コラーゲン抗体を用いた免疫組織標本.

A: 中央部角膜. 上皮基底膜(矢印)以外に上皮直下の実質浅層も染色されている(*).

B: 周辺部角膜. 上皮基底膜(矢印)のみ陽性である. バーは50 μ m

て, 軽度の陽性所見が観察された(図7A). 一方, 同一角膜の表層切除を施行していない周辺部の角膜上皮実質浅層は抗III型コラーゲン抗体に対し陽性所見は全くなかった(図7B). 術後3年目の角膜においても, 2年目のそれに比べ中央上皮実質浅層の陽性所見がやや弱く

なっていたものの, ほぼ同様の所見であった(図8). 抗IV型コラーゲン抗体に対する陽性所見も, 術後2年目(図9)と3年目(図10)の角膜ではほぼ同様であった. すなわち, 角膜周辺部では, 上皮基底膜のみ直線状に染色されていたのに対し, 表層切除した中央部分では, 基底膜が線

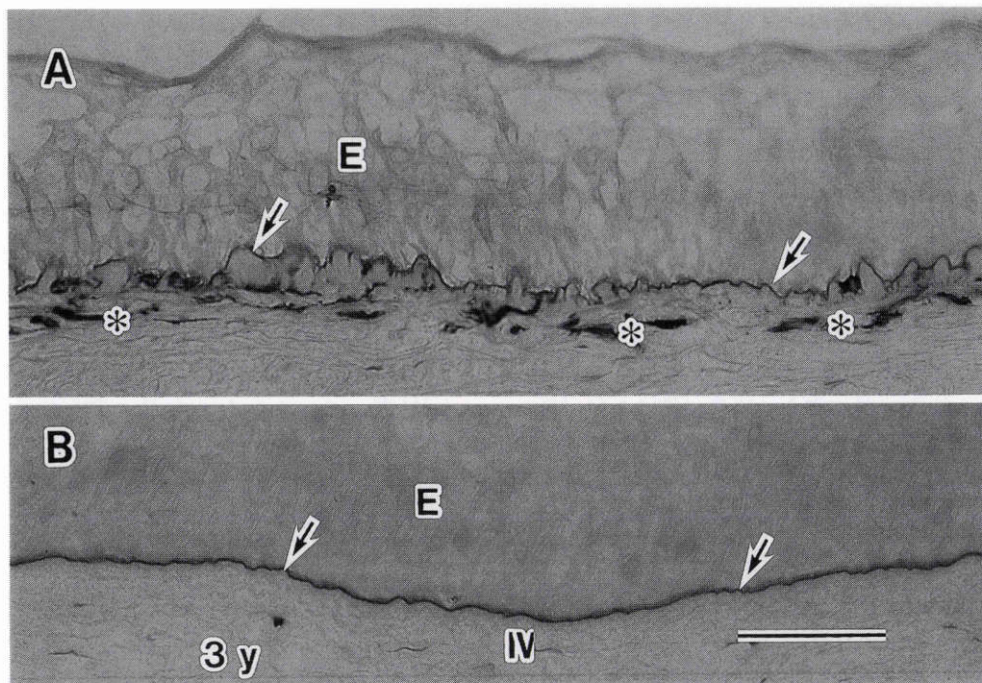


図 10 術後 3 年目. 抗 IV 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織標本.

A: 中央部角膜. B: 周辺部角膜. 2 年目と同様に, 中央部では基底膜(矢印)の他, 上皮下実質浅層(*)に陽性所見が観察されるものの, 周辺部では基底膜(矢印)のみ陽性である. バーは 50 μ m

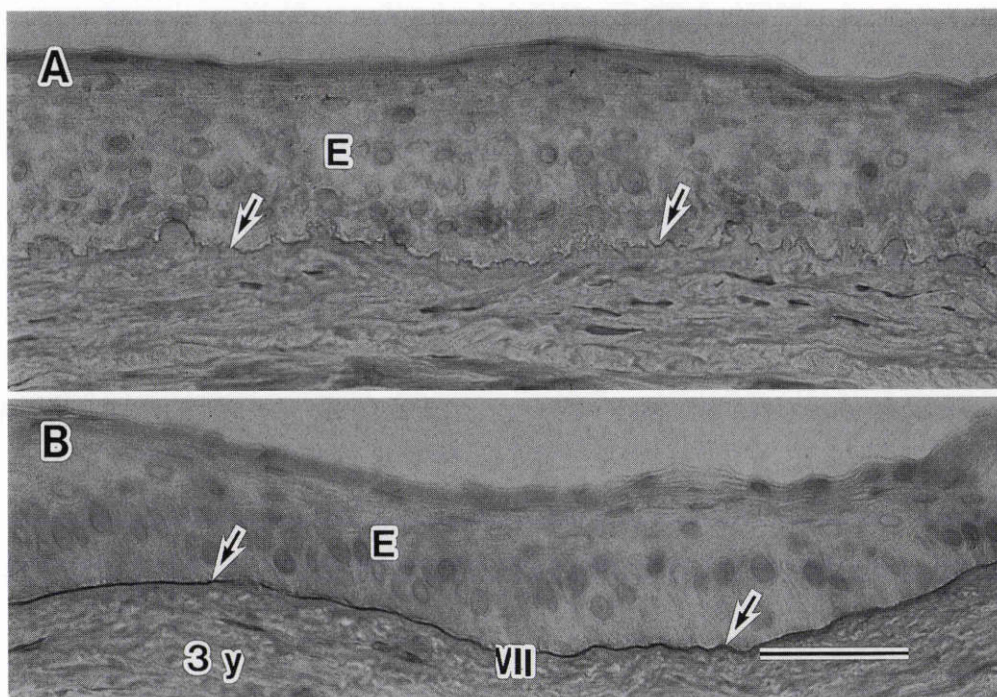


図 11 術後 3 年目. 抗 VII 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織標本.

A: 中央部角膜. 波状の上皮基底膜が弱く染色されている(矢印).

B: 周辺部角膜. 上皮基底膜が線状に染色されている(矢印). バーは 50 μ m

状または波状に染色されていた他, 上皮下実質浅層にも所々陽性所見が観察された. さらに, VII 型コラーゲンに対する抗体では, 周辺部角膜の基底膜では線状に強い陽性所見を示したが, 術後 2, 3 年目(図 11)の角膜中央部では陽性反応が弱く, 特に基底膜が波状を呈している部分

では, さらに弱く一部に消失している所もあった.

IV 考 按

今回の実験に供した家兎は, 13~17 週齢で表層角膜切除を施行し, その後 2 および 3 年経過している. 家兎の寿

命は、飼育環境の整った所であれば5~7年であるが、実験動物舎のケージ内で飼育された場合は、3~4年程度と考えられている。我々の観察した2,3年目の家兎がヒトのどのくらいの年齢に対応しているのか厳密には不明であるが、少なくとも中年以上には達しているものと考えられる。

エキシマレーザーの使用の有無に拘わらず、臨床的に角膜表層切除を施行した場合、上皮細胞の再被覆は、通常3~4日間、遅くとも1週間以内には終了する。しかし、病理組織学的にみると、再被覆された上皮細胞、特に基底細胞や上皮実質間の接着装置が完全に正常に復するにはかなりの期間を要するものと思われる。今回の観察結果では、エキシマレーザー表層切除後2および3年目の家兎角膜においても、上皮基底細胞の形状はやや不整であった。さらに、上皮基底膜についても、術後2,3年経過しても強い凹凸や基底膜の上皮側へのスパイク状の突出が観察される場合があった。

Fountain ら⁸⁾はエキシマレーザー角膜表層切除後6~15か月までのヒト角膜を電子顕微鏡を用いて観察し、術後15か月においても切除部分の上皮接着装置は完全に正常に復していなかったと述べている。また、Gibson ら⁹⁾はエキシマレーザーを用いない機械的角膜表層切除術を家兎角膜に施行し、術後早期の上皮接着装置は不連続であったが、時間とともに再生が進み、徐々に連続性となるものの、ハーフデスモゾームの完全な再生には少なくとも1年を要すると報告している。今回の我々の観察でも、術後3年目の家兎角膜で基底膜の凹凸不正な部分には、接着装置が少なくなっていた。また、ハーフデスモゾームを構成するアンカリングフィブリルと考えられているVII型コラーゲン¹⁰⁾に対する抗体を用いた観察でも、非切除部分の周辺角膜では基底膜付近が強く直線状に陽性所見を示したのに対し、切除部分の陽性所見は弱く、特に凹凸不正の強い部分では、さらに染色性が弱くなっていた。Anderson ら¹¹⁾もエキシマレーザー表層角膜切除後のヒト角膜を抗VII型コラーゲン抗体を用いて染色し、16か月目においてもその陽性反応はirregularであったと報告しており、我々の結果と一致している。ただし、上皮接着装置の再生は、年齢¹²⁾、切除深度¹³⁾、上皮・実質の状態などによっても影響を受けるものと考えられている。特に今回のような長期にわたる実験では、接着装置の加齢変化には注意を払う必要がある。Alvarado ら¹²⁾はヒト角膜における上皮基底膜および接着装置の加齢変化を観察し、加齢による基底膜の肥厚、重層化、ハーフデスモゾームの減少などを指摘している。今回の我々の観察でも表層切除による影響に加え、加齢変化の一部も加わっている可能性は否定できない。しかし、光学顕微鏡レベルでも、またIV型、VII型コラーゲン抗体を用いた検索でも、表層切除部分と周辺部分では明らかに所見が異なっており、観察結果の異常所見の多くはエキシマレーザー表層

切除による変化と考えて良いものと思われた。

Anderson ら¹¹⁾はIII型・IV型コラーゲンの局在についても抗体を用いた検索を試みている。III型コラーゲンは本来生体内でI型コラーゲンと同様の分布を示し、角膜実質にも局在する間質型コラーゲン線維であるが¹⁴⁾、創傷治癒過程で出現する瘢痕組織を構成するコラーゲン線維としても良く知られている¹⁵⁾。我々は既にこのIII型コラーゲンが初期の上皮下混濁の構成成分の一つであり、上皮下混濁とは角膜実質の瘢痕組織であると指摘してきた⁷⁾。この観点から考えると、今回2,3年目においてもIII型コラーゲンが上皮下に局在していたことは、未だに瘢痕組織が正常の角膜実質に置き換わっておらず、表層切除角膜の創傷治癒が終了していないことを示していると考えられた。一方、IV型コラーゲンは、基底膜の構成成分の一つと考えられているものの、近年いくつかのisoformが見出され¹⁶⁾¹⁷⁾、ヒト角膜上皮基底膜は、部位によって異なったisoformのIV型コラーゲンが分布していることが明らかとなった¹⁸⁾。

我々の用いた抗体は、ヒトのIV型コラーゲンに対するモノクローナル抗体であるが、正常のヒト(データ未発表)および家兎の角膜上皮基底膜は、角膜のどの部位においても一様に線状に陽性所見を示した。恐らく、今回用いた抗体のエピトープは、ヒトおよび家兎のどのisoformのIV型コラーゲンにも共通する部位であろうと考えられた。エキシマレーザー表層切除後の上皮下混濁部分には、術後3年経過してもIII型同様このIV型コラーゲンも局在し、実質の瘢痕組織形成に関与しているものと考えられた。このIV型コラーゲンは、従来から考えられていた基底膜のIV型コラーゲンと異なるisoformのコラーゲンである可能性があるものの、今回の実験では不明のままであった。また、これらIII型、IV型コラーゲン線維の産生細胞については、上皮細胞および術後数週間に上皮下に集合した線維芽細胞様の実質細胞の2つが考えられる。Ljubimov ら¹⁹⁾の報告では、IV型コラーゲンの α_3 、 α_4 、 α_5 の各chainに対する抗体は、角膜実質細胞周囲にも陽性所見を示したと報告しており、一部のIV型コラーゲンを実質細胞が産生している可能性は否定できない。この解明には*in situ* ハイブリダイゼーションなどの手法が必要であり、現在検索中である。

デスメ膜内に観察された物質は、術後3年目の角膜では実質との境界面から約5~6 μ m付近に局在していた。これは手術時に内皮細胞が産生分泌し、その後加齢に伴ってデスメ膜が肥厚するとともに相対的に実質側へ移行したものと考えられた。この沈着物質は通常の電子染色ではネガティブ染色となったものの、タンニン酸で染色すると横走するバンドが観察され、コラーゲン線維様の物質であることが明らかとなった。

文 献

- 1) **Rasmussen RE, Hammer-Wilson M, Berns MW** : Mutation and sister chromatid exchange induction in chinese hamster ovary (CHO) cells by pulsed excimer laser radiation at 193 nm and 308 nm and continuous UV radiation at 254 nm. *Photochem Photobiol* 49 : 413—418, 1989.
- 2) **Tuft SJ, Zabel RW, Marshall J** : Corneal repair following keratectomy. A comparison between conventional surgery and laser photoablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 1769—1777, 1989.
- 3) **Rawe IM, Zabel RW, Tuft SJ, Chen V, Meek KM** : A morphological study of rabbit corneas after laser keratectomy. *Eye* 6 : 637—642, 1992.
- 4) **Gartry DS, Kerr Muir MG, Lohmann CP, Marshall J** : The effect of topical corticosteroids on refractive outcome and corneal haze after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 110 : 944—952, 1992.
- 5) **寄井秀樹, 高橋圭三** : 術後管理・Eye Surgery Now Illustrated 3. 大橋裕一(編) : メディカルビュー社, 東京, 122—131, 1997.
- 6) **中安清夫, 後藤淑子, 石川 隆, 金井 淳** : エキシマレーザー角膜表層切除後上皮下混濁のグリコサミノグリカン. *日眼会誌* 100 : 350—357, 1996.
- 7) **中安清夫** : エキシマレーザー角膜表層切除後の上皮下混濁. *日本コンタクトレンズ誌* 39 : 補遺 9—15, 1997.
- 8) **Foutain TR, de La Cruz Z, Green WR, Stark WJ, Azar DT** : Reassembly of corneal epithelial adhesion structures after excimer laser keratectomy in humans. *Arch Ophthalmol* 112 : 967—972, 1994.
- 9) **Gibson IK, Spurr-Michand S, Tisdale A, Keough M** : Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 425—434, 1989.
- 10) **Gibson IK, Spurr-Michand S, Tisdale A** : Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 212—220, 1987.
- 11) **Anderson JA, Binder PS, Rock ME, Vrabec MP** : Human excimer laser keratectomy. Immunohistochemical analysis of healing. *Arch Ophthalmol* 114 : 54—60, 1996.
- 12) **Alvarado J, Murphy C, Juster R** : Age-related changes in the basement membrane of the human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1015—1028, 1983.
- 13) **SundarRaj N, Geiss III MJ, Fantes F, Hanna K, Anderson SC, Thompson KP, et al** : Healing of excimer laser ablated monkey corneas. An immunohistochemical evaluation. *Arch Ophthalmol* 108 : 1604—1610, 1990.
- 14) **Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T** : Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 18 : 1—10, 1986.
- 15) **早川太郎** : 創傷治癒とコラーゲン代謝. コラーゲン代謝と疾患. 藤本大三郎, 他(編) : 講談社, 東京, 206—213, 1982.
- 16) **Timpl R** : Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180 : 487—502, 1989.
- 17) **Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoythya M, Shows TB, Tryggvasson K** : Identification of a distinct type IV collagen α chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1606—1610, 1990.
- 18) **Ishizaki M, Westerhausen-Larson A, Kino J, Hayashi T, Kao W W-Y** : Distribution of collagen IV in human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2680—2689, 1993.
- 19) **Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun T-T, Kenney MC** : Human corneal basement membrane heterogeneity : Topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Laborat Invest* 72 : 461—473, 1995.