

平成 19 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

生体レーザー共焦点顕微鏡を用いた Bowman 層・実質境界面の解析

小林 顕

金沢大学医薬保健研究域医学系視覚科学

要 約

近年、波長 670 nm のダイオードレーザーを光源とする角膜専用生体レーザー共焦点顕微鏡 (HRT II ロストック角膜モジュール, ハイデルベルグ社, ドイツ) が開発され, 解像度の高い生体角膜前額断面像が得られるようになった. 本装置を用いて詳細な Bowman 層近傍の解析を行ったところ, Bowman 層・実質境界面のレベルに存在する網状・線維状構造物を初めて確認した (K-structure と命名). 本総説論文では, この構造物の生体レーザー共焦点顕微鏡所見について紹介し, 過去の組織学的報告との対応を試みた. また, モジュール先端

部を用いて角膜に軽く圧迫を加えながら観察した際に, 本構造物に一致した隆起が角膜上皮基底層のレベルに形成されることを見出した. これらの所見から, 本構造物は角膜実質コラーゲン線維終末部の前額断面の所見であると推測し, 角膜(フルオレセイン)モザイク発生の解剖学的原因であるとの仮説を提唱した. (日眼会誌 112 : 947—952, 2008)

キーワード : 生体レーザー共焦点顕微鏡, 角膜, Bowman 層, K-structure, 角膜モザイク

A Review

In Vivo Laser Confocal Microscopic Analysis of the Interface between Bowman's Layer and the Stroma of the Cornea

Akira Kobayashi

Department of Ophthalmology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science

Abstract

Recently, cornea-specific *in vivo* laser confocal microscopy (Heidelberg Retina Tomograph 2 Rostock Cornea Module (HRT2-RCM), Heidelberg Engineering GmbH, Dossenheim, Germany) has become available, are now possible detailed *in vivo* observation of corneal and conjunctival microstructure. Using HRT2-RCM, we have demonstrated the presence of "polymorphic structures composed of fibrillar material" beneath Bowman's layer in normal volunteer eyes. We surmise that these microstructures may correspond to the modified and condensed anterior stromal collagen fibers/lamellae that merge into Bowman's layer. We also observed numerous ridges protruding into the epithelial basal and wing

cell layers after application of pressure with a Tomocap[®]. These ridges corresponded exactly to the orientation of the K-structures beneath the epithelial cells, suggesting that these ridge formations correspond to the pattern of the anterior mosaic formation. The potential association of these microstructures with anterior corneal mosaic formation is also discussed in this review.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 947—952, 2008)

Key words : *In vivo* laser confocal microscopy, Cornea, Bowman's layer, K-structure, Corneal mosaic

別刷請求先 : 920-8641 金沢市宝町 13-1 金沢大学医薬保健研究域医学系視覚科学 小林 顕

(平成 20 年 4 月 3 日受付, 平成 20 年 6 月 10 日改訂受理) E-mail : kobaya@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

Reprint requests to : Akira Kobayashi, M. D. Department of Ophthalmology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, 13-1 Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa-ken 920-8641, Japan

(Received April 3, 2008 and accepted in revised form June 10, 2008)

I はじめに

共焦点顕微鏡は、厚みのある試料中の特定の面に焦点を合わせ、同時に焦点の合っていない上下の面からの余分な反射光を除外することで、一定の焦点面のみコントラスト比の高い鮮明な画像を得ることができる。共焦点顕微鏡の角膜への応用は1990年代から始められ、角膜を構成する細胞層や神経線維の前額断面が非侵襲的に生体観察できるようになり、研究のみならず臨床にも応用されてきた¹⁾²⁾。我々はこれまでに、白色光(ハロゲンランプ)を光源とするスリット走査型生体共焦点顕微鏡(Confoscan[®]2, Nidek社)を用いた角膜研究を行ってきた^{3)~10)}。近年、レーザーを光源とする角膜専用生体レーザー共焦点顕微鏡(HRT IIロストック角膜モジュール, ハイデルベルグ社, ドイツ)が開発された¹¹⁾¹²⁾。我々は、本装置を用いて詳細なBowman層近傍の解析を行った結果、Bowman層・実質境界面に存在する網状・線維状構造物を初めて確認した(K-structureと命名)¹³⁾。本総説論文では、この構造物の生体レーザー共焦点顕微鏡所見について紹介し、過去の組織学的報告との対応を試み、本構造物と角膜(フルオレセイン)モザイクとの関連性についても論じる。

II HRT IIロストック角膜モジュールの概要

ハイデルベルグレチナトモグラフII(以下HRT II, ハイデルベルグ社, ドイツ)は、視神経乳頭の三次元画像を取り込み解析するための共焦点レーザー走査型顕微鏡であり、臨床においては主に緑内障の診断に用いられている。これに角膜観察用アタッチメントであるロストック角膜モジュール(図1A)を装着することにより、角膜全層の二次元および三次元画像を取り込むことができる¹¹⁾(図1B)。本装置では共焦点光学系を用いることにより、従来の細隙灯顕微鏡では困難であった角膜の任意の部位(例:上皮, 実質, 内皮など)における“前額断”の観察が可能である(図2A~J)。さらに、従来型の白色光を使用した共焦点顕微鏡と異なり、光源として波長670 nmのダイオードレーザーを用いているため、より鮮明で解像度の高い断面像を得ることができ、その結果、角膜のみならず、結膜やマイボーム腺の観察も可能となった¹⁴⁾。なお、本装置では、60倍の水浸対物レンズ(Olympus Europa GmbH, ハンブルク, ドイツ)を使用している。得られる二次元画像は384×384ピクセルの解像度をもち、これは角膜上の0.4×0.4 mmの範囲に相当する。三次元画像は、40枚の連続的で等間隔(2 μm)の二次元の光学切片のシリーズ画像として生成される¹⁵⁾。ロストック角膜モジュールの光学系の前面は、使い捨てのポリメチルメタクリレート製滅菌カバー(Tomo-cap[®]) (図1A 矢印)で覆われており、検査時には

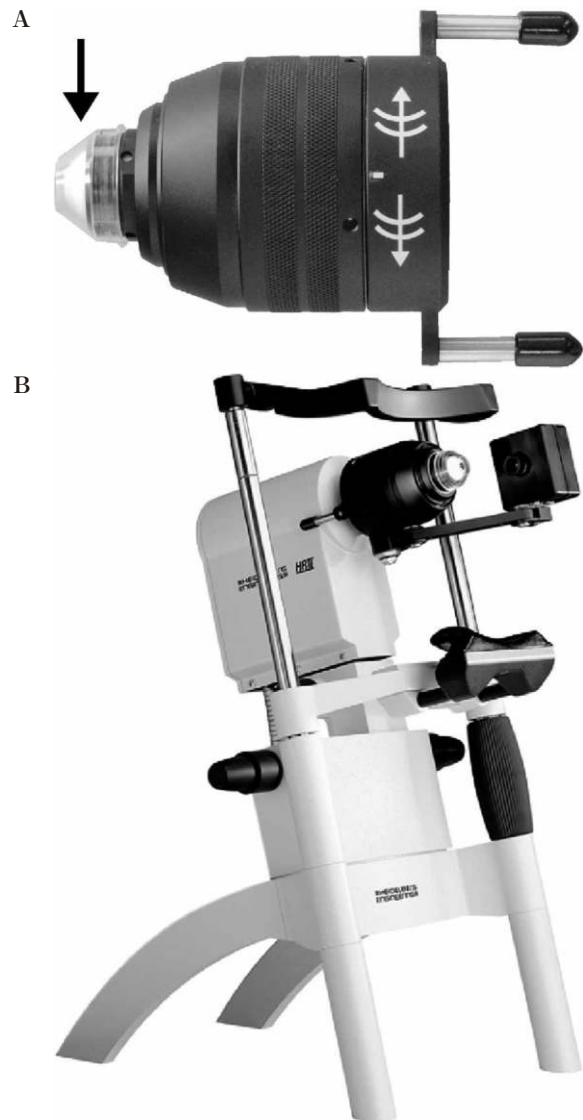


図1 生体レーザー共焦点顕微鏡。

- A: ロストック角膜モジュール対物レンズ。先端部光学レンズ部分は使い捨てのポリメチルメタクリレート製滅菌カバー(Tomo-cap[®]) (矢印)で覆われている。
B: ロストック角膜モジュールを装着したHRT II (ハイデルベルグ社, ドイツ)の概観。

被検者の角膜に接触する。焦点位置はこのキャップ前面に設計されており、角膜内皮細胞を含む角膜の全組織の観察が行え、回転リングを回すことにより焦点位置を調整することができる。

III 正常角膜の生体レーザー共焦点顕微鏡所見

HRT IIロストック角膜モジュールを用いて角膜中心部を観察すると、最表層から順に角膜上皮表層細胞層(図2A)、上皮翼状細胞層(図2B)、上皮基底細胞層(図2C)、Bowman層(図2D)、Bowman層・実質境界線維状構造物(K-structure)¹³⁾(図2E~H)、角膜実質細胞層(図2I)、Descemet膜、角膜内皮細胞層(図2J)が観察される。上皮表層細胞は直径50 μm程度の高輝度

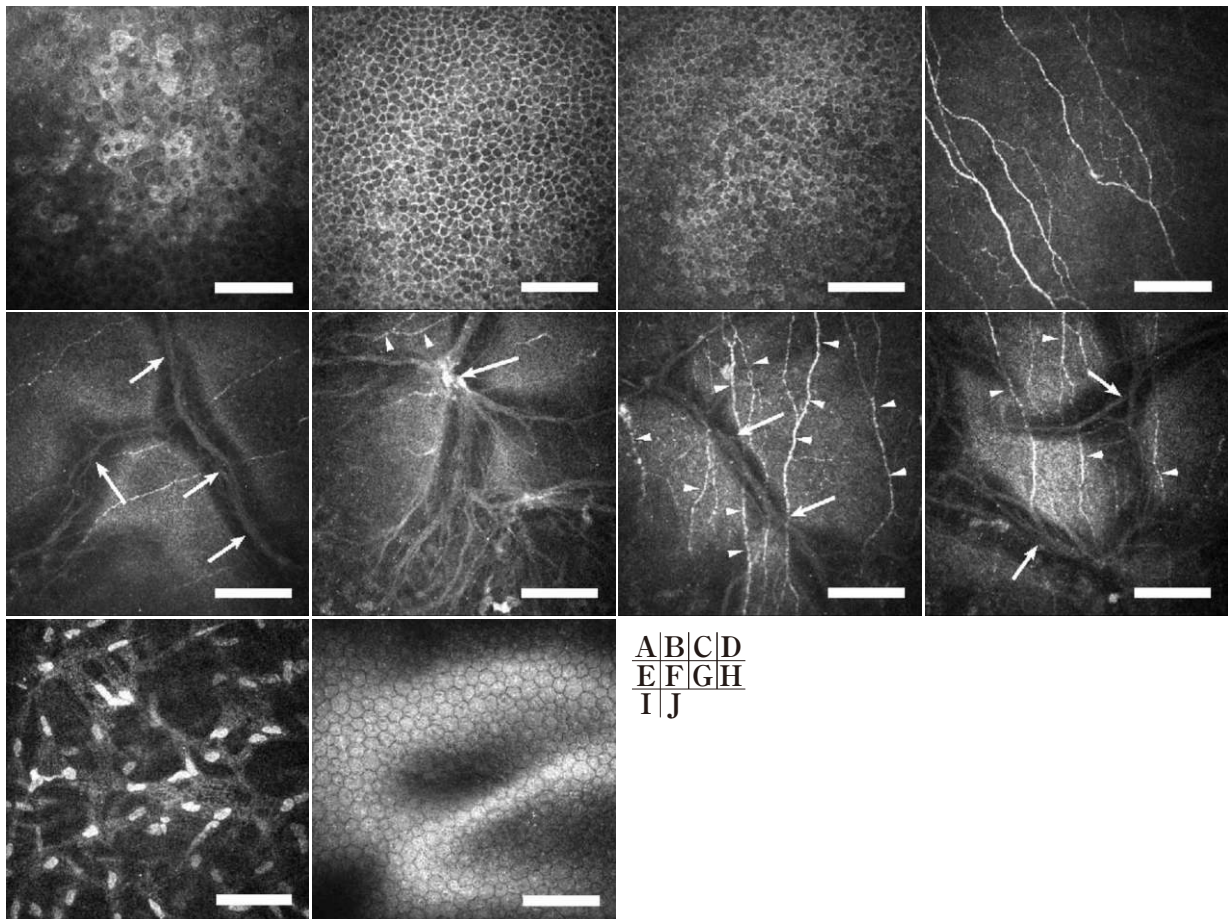


図 2 正常角膜中心部のレーザー共焦点顕微鏡所見(23 歳女性).

A : 上皮表層細胞層 (Bar=100 μm , 以下同様). B : 角膜上皮翼状細胞層. C : 角膜上皮基底細胞層. D : Bowman 層. 角膜上皮神経叢が認められる. E, F, G, H : Bowman 層と角膜実質の境界面領域には角膜実質のコラーゲン線維の終末部と考えられる構造(矢印)(K-structure)が観察される. 矢頭は上皮神経を示す. I : 角膜実質. 多くの実質細胞の核が観察される. J : 角膜内皮層.

(Kobayashi A, et al : Ophthalmology 113 : 2203-2208, 2006 より許可を得て転載).

の細胞質をもつ多角形細胞として観察され, 周囲に低輝度のハローを伴う高輝度の核も観察される(図 2 A). 上皮翼状細胞層は表層細胞に比較してやや小さめ(直径 20 μm 程度)で, 低輝度の細胞質, 高輝度の細胞境界により比較的均一なモザイク状に観察される(図 2 B). 上皮基底細胞層はさらに小さいモザイク状の細胞(直径 8~10 μm 程度)として観察される(図 2 C). 本装置では角膜上皮細胞基底膜の同定は不能である. Bowman 層はそれ自体の同定は難しいが, 上皮神経叢のレベルの無細胞領域の面として確認可能である(図 2 D). Bowman 層と角膜実質の境界面領域には線維状構造物(K-structure)が観察される¹³⁾(図 2 E~H 矢印). 角膜実質では, 卵型をした高輝度の細胞核が観察される(図 2 I). 角膜内皮細胞層はスペキュラースコープで観察されるものと類似の所見が得られる(図 2 J).

IV K-structure の特徴

Bowman 層と角膜実質の境界面領域には, 角膜上皮

下神経より若干輝度の低い線維状の不定形構造物が認められ(図 2 E~H), 網目状のネットワークを形成していた. この構造物は上皮神経叢よりわずかに実質側に位置しており, 幅は 5~15 μm 程度であった. 本構造物は, 我々が調べたすべての健常人(男性 10 人, 女性 9 人, 平均年齢 46.2 歳, 18~77 歳)において観察され, 角膜中央部と同様に, 周辺部角膜でも確認できた. 本構造物は, 従来の白色光源生体共焦点顕微鏡では同定が不可能であり, レーザー生体共焦点顕微鏡にて初めて可視化に成功した. これまでに報告のない構造物のため, 我々は K-structure と命名した. K-structure は若年成人において, 特にその線維状の構造がより顕著に観察された(図 3 A). また, Bowman 層ジストロフィ(Thiel-Behnke 角膜ジストロフィ, Reis-Bücklers 角膜ジストロフィ)においては, K-structure は消失していた¹⁶⁾. さらに, 角膜屈折矯正手術後において, Bowman 層が温存される laser *in situ* keratomileusis 後には K-structure は観察されるが, Bowman 層が破壊される epipolis laser

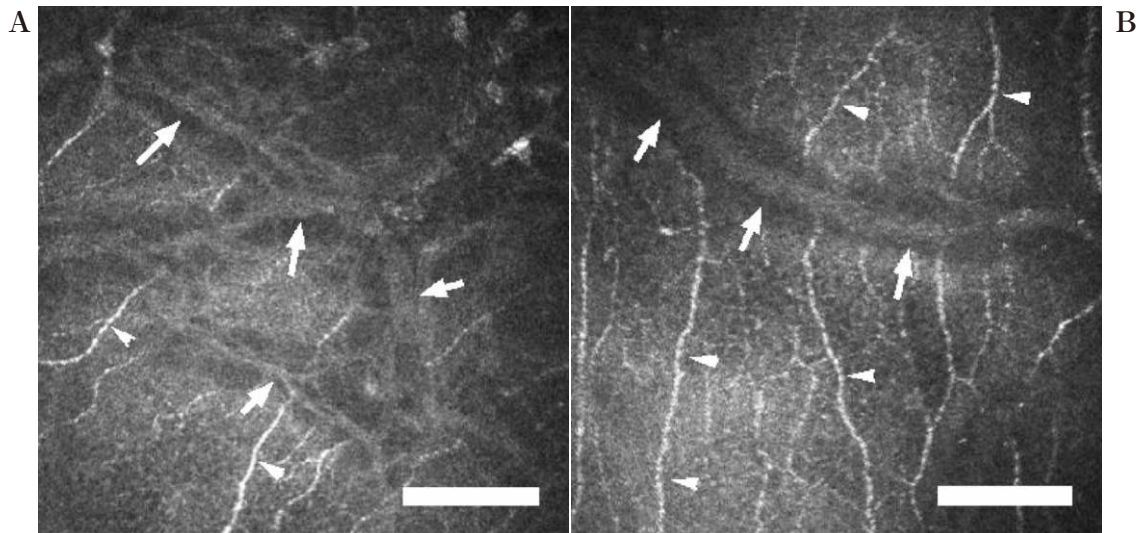


図 3 若年者と高齢者における K-structure の違い.

A : 21 歳女性における K-structure (矢印) はより鮮明に観察することが可能で, 線維状の構造がはっきりと観察される. 矢頭は上皮神経を示す. Bar = 100 μ m. B : 69 歳女性における K-structure (矢印) は観察可能であるが, 線維状の構造などの詳細な観察は困難である. 矢頭は上皮神経を示す. Bar = 100 μ m.

(Kobayashi A, et al : Ophthalmology 113 : 2203-2208, 2006 より許可を得て転載).

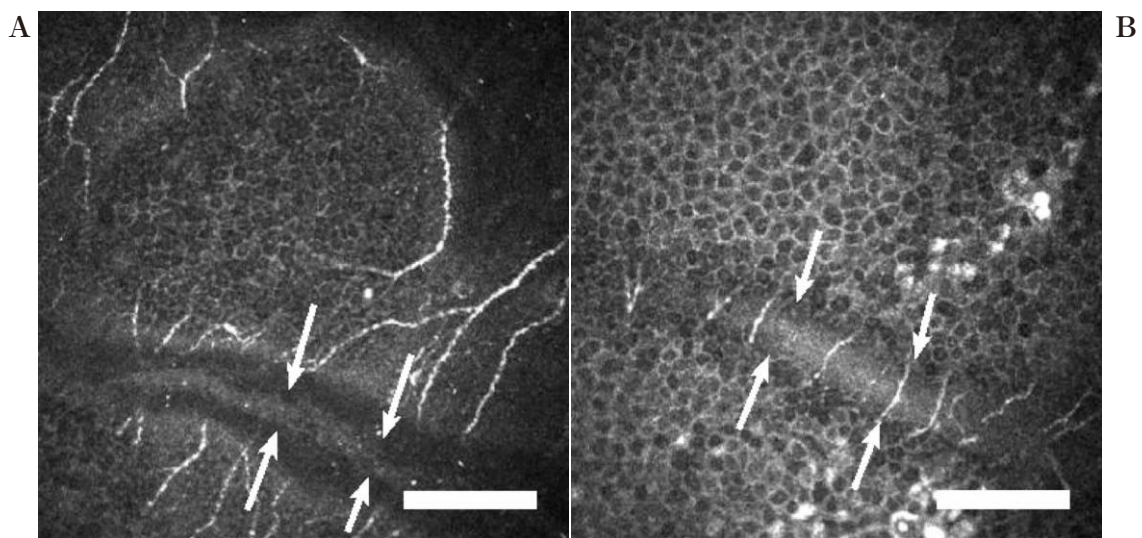


図 4 角膜モジュールの先端キャップ (Tomo-cap[®]) を用いて, 角膜中心部を軽く圧迫した場合のレーザー共焦点顕微鏡所見.

A : 上皮基底層. 翼状層に向かって盛り上がり (ridge) が形成された所見 (矢印). 先端キャップの圧迫のない状態では, この盛り上がりは観察されなかった. Bar = 100 μ m. B : これらの盛り上がりの位置と方向は上皮細胞下に存在する K-structure (矢印) の位置と向きに完全に一致していた. Bar = 100 μ m.

(Kobayashi A, et al : Ophthalmology 113 : 2203-2208, 2006 より許可を得て転載).

in situ keratomileusis 後には K-structure は消失していた (未発表データ). なお, Bowman 層が存在しないとされるブタやウサギ角膜を本装置で観察したところ, K-structure は確認できなかった. これらの事実は, Bowman 層と K-structure の強い関連性を示唆する所見である.

顕微鏡先端部のカバー (Tomo-cap[®]) を用いて角膜に軽く圧迫を加えながら角膜を観察することにより, 本構造物に一致した隆起 (ridge) を角膜上皮基底層レベルにおいて確認できた (図 4 A). この隆起は, 直下に観察される K-structure の方向に完全に一致しており (図 4 B), K-structure との強い関連性が示唆された. なお, 角膜

に圧迫を加えない状態では、この隆起が観察されることはない。

V Bowman 層の解剖

Bowman 層は角膜上皮の下に位置しており、8~10 μm の厚さを有している¹⁷⁾。電子顕微鏡による観察では、Bowman 層はさまざまな方向性をもつ直線状のコラーゲン線維よりなるフェルト状の構造をしている^{18)~20)}。Bowman 層内では、角膜上皮に向かう神経軸索が走行しているが、それ以外は無細胞性である。Bowman 層の前面は角膜上皮の基底膜の lamina densa によって、明瞭に境界されている。Bowman 層の後面は、その直下の角膜実質表層からのコラーゲン線維と融合している^{18)~20)}。時として、大きな実質線維(ラメラ)が斜め方向に走行し、Bowman 層に融合する。

VI 角膜モザイクとの関連性

Bron ら^{21)~23)}は、フルオレセイン滴下後に角膜をまぶたの上からマッサージすることにより生じる網目状のフルオレセインパターン(角膜モザイク)の詳細を報告した。この角膜モザイクパターンの出現は、フルオレセインの溜まる細い溝が蜂巢状に角膜上に生ずることが原因である(groove pattern)。ただし、ハードコンタクトレンズを装用する円錐角膜の患者においては、まぶたの上からのマッサージなしでも 75% の患者において角膜モザイクパターン(groove pattern)がみられるという²⁴⁾。また、これとは逆のモザイクパターン(モザイクの中央部がフルオレセインで染色され、モザイクを形成する線は非染色)は Goldmann 眼圧計にて眼圧を測定する際の角膜の圧迫中などに観察される(ridge pattern)²⁵⁾。さらに Bron ら²³⁾は、角膜のモザイク状の隆起(ridge pattern)は涙液の乾燥によって生じることを示した。Bron らは、これら両パターン(groove pattern, ridge pattern)のモザイク形状が、同一角膜では同じ形を示すことから、角膜モザイク発生の解剖学的原因は Bowman 層内か、Bowman 層近傍に存在する弾性的性質をもった網目状の構造物であると推察した²³⁾。以下の文章は Bron らの仮説である。通常の眼圧下の角膜にはフルオレセインを滴下しても角膜モザイクはみられない。しかし、角膜に圧迫を加えた場合には Bowman 層の緊張は高まり、網目状の構造物は、まわりの角膜組織に比較してやや硬度が高いために、角膜上皮基底層へわずかに突出して隆起を形成する(ridge pattern)。この際、角膜上皮層は網目状の構造物による隆起と角膜上への圧迫により押しつぶされて、厚さが一時的に薄くなる。その後、角膜への圧迫を解除することにより、網目状の構造物が本来の位置に戻り、角膜上皮は構造物に沿った圧迫で薄くなっているために、結果として一時的な上皮のくぼみが網目状構造物に沿って形成される(groove pattern)。

フルオレセイン滴下後の眼瞼上からの角膜マッサージは、角膜に圧迫とその解除を繰り返すことになるので、形成された溝にフルオレセインが溜まり、角膜モザイクが発生する。以上が Bron らによるフルオレセイン角膜モザイク発生に関する仮説である²¹⁾。その後、1975 年に Tripathi と Bron²⁶⁾は、角膜実質表層コラーゲンラメラが Bowman 層実質側に融合しているという解剖学的な構造が角膜モザイクの発生原因であると結論した。なお、緑内障濾過胞手術直後など眼圧が極度に低下した際などに観察される、フルオレセイン角膜モザイクの発生機序も、正常の Bowman 層の緊張が眼圧低下により失われたためと考えると説明が可能である。

これらの観察は、我々がロストック角膜モジュール先端部のカバーで角膜に軽く圧迫を加えた際に、K-structure に一致した隆起(ridge)を角膜上皮基底層レベルにおいて確認できたのとよく符合し、さらにこの隆起は、直下に観察される K-structure の方向に完全に一致していることから、K-structure は角膜実質コラーゲン線維終末部(ラメラ)の前額断面の所見であると推測し、よって K-structure は角膜(フルオレセイン)モザイク発生の解剖学的原因であると推察した¹³⁾。

VII おわりに

生体共焦点顕微鏡の光源としてレーザー光を用いることにより、解像度の高い生体角膜前額断面画像が得られるようになった。その結果、本総説で述べたような、従来の白色光源生体共焦点顕微鏡では観察できなかった構造物(K-structure)を可視化することに成功した。我々は、本構造物は角膜実質コラーゲン線維終末部の前額断面の所見であると推測し、角膜(フルオレセイン)モザイク発生の解剖学的原因であるとの仮説を提唱したが、その仮説を証明するためには、K-structure の広範囲マッピングを行い、実際のヒト角膜における角膜(フルオレセイン)モザイク形状と対応するかどうかを調べる必要がある。

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与您てくださいました学術奨励賞選考委員各位、第 112 回日本眼科学会総会長新家 眞教授に心より感謝申し上げます。また、研究のご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系視覚科学の杉山和久教授、研究に協力していただいた金沢大学医薬保健研究域医学系視覚科学の横川英明先生と外来スタッフに深謝いたします。

文 献

- 1) Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV: Clinical and diagnostic use of *in vivo* confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 100: 1444-1454,

- 1993.
- 2) **Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, Cohen EJ, Meisler DM, Reinhart WJ, et al** : Confocal microscopy : a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 111 : 396—406, 2004.
 - 3) **Kobayashi A, Sugiyama K** : *In vivo* corneal confocal microscopic findings of palisades of Vogt and its underlying limbal stroma. *Cornea* 24 : 435—437, 2005.
 - 4) **Kobayashi A, Sugiyama K, Huang AJ** : *In vivo* confocal microscopy in patients with central cloudy dystrophy of Francois. *Arch Ophthalmol* 122 : 1676—1679, 2004.
 - 5) **Kobayashi A, Ohkubo S, Tagawa S, Uchiyama K, Sugiyama K** : *In vivo* confocal microscopy in the patient with cornea farinata. *Cornea* 22 : 578—581, 2003.
 - 6) **Kobayashi A, Maeda A, Sugiyama K** : *In-vivo* confocal microscopy in the acute phase of corneal inflammation. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 34 : 433—436, 2003.
 - 7) **Kobayashi A, Sakurai M, Shirao Y, Sugiyama K, Ohta T, Amaya-Ohkura Y** : *In-vivo* confocal microscopy and genotyping of a family with Thiel-Behnke (Honeycomb) corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 121 : 1498—1499, 2003.
 - 8) **Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K** : White-light and laser confocal microscopic findings of rabbit conjunctiva. *Ophthalmic Surgery Lasers and Imaging* 35 : 146—148, 2004.
 - 9) **Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K** : *In vivo* laser and white-light confocal microscopic findings of human conjunctiva. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 35 : 482—484, 2004.
 - 10) **Kobayashi A, Sugiyama K** : *In vivo* confocal microscopy in a patient with keratopigmentation (corneal tattooing). *Cornea* 24 : 238—240, 2005.
 - 11) **Stave J, Zinser G, Grummer G, Guthoff R** : Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of *in vivo* presentation of corneal structures. *Ophthalmologie* 99 : 276—280, 2002.
 - 12) **Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff R** : *In vivo* confocal microscopy of the ocular surface. *The Ocular Surface* 4 : 81—93, 2006.
 - 13) **Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K** : *In vivo* laser confocal microscopy of Bowman's layer of the cornea. *Ophthalmology* 113 : 2203—2208, 2006.
 - 14) **Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K** : *In vivo* findings of bulbar/palpebral conjunctiva and presumed meibomian gland by laser scanning confocal microscopy. *Cornea* 24 : 985—988, 2005.
 - 15) Heidelberg Retina Tomograph 2 (Rostock Cornea Module) Operating Instructions of Software Version 1.1. Dossenheim, Germany, 2004.
 - 16) **Kobayashi A, Sugiyama K** : *In vivo* laser confocal microscopy findings for Bowman's layer dystrophies (Thiel-Behnke and Reis-Bücklers corneal dystrophies). *Ophthalmology* 114 : 69—75, 2007.
 - 17) **Arfa RC** : Anatomy : Grayson's disease of the cornea. 4th ed. Mosby-Year Book, Inc, St. Louis, 1—23, 1997.
 - 18) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell E** : Histology of the human eye, WB Saunders, Philadelphia, 55—111, 1971.
 - 19) **Komai Y, Ushiki T** : The three-dimensional organization of collagen fibrils in human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 2244—2258, 1991.
 - 20) **Smolek MK, Klyce SD** : Ocular anatomy, embryology, and teratology : Cornea. In : Tasman W, et al (Eds) : Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Lippincott, Philadelphia, 1997.
 - 21) **Bron AJ** : Anterior corneal mosaic. *Br J Ophthalmol* 52 : 659—669, 1968.
 - 22) **Bron AJ** : Photography of corneal pattern. *Arch Ophthalmol* 79 : 119—120, 1968.
 - 23) **Bron AJ, Tripathi RC** : Anterior corneal mosaic. Further observations. *Br J Ophthalmol* 53 : 760—764, 1969.
 - 24) **Dangel ME, Kracher GP, Stark WJ** : Anterior corneal mosaic in eyes with keratoconus wearing hard contact lenses. *Arch Ophthalmol* 102 : 888—890, 1984.
 - 25) **Norn MS** : Schweitzer's polygonal fluorescein pattern on the cornea. A clinical study and comparison with an applanation-prism-net-phenomenon. *Acta Ophthalmol(Copenh)*. 46 : 700—711, 1968.
 - 26) **Tripathi RC, Bron AJ** : Secondary anterior crocodile shagreen of Vogt. *Br J Ophthalmol* 59 : 59—63, 1975.
-