

平成 22 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

第二次高調波発生を用いた正常角膜と疾患角膜の構造解析

森重 直行

山口大学大学院医学系研究科上皮情報解析医学系学域眼科学分野

要 約

第二次高調波発生 (second harmonic generation : SHG) は、非線形光学系の一つであり、角膜からの SHG はコラーゲン由来のものと考えられている。SHG を検出する SHG 顕微鏡はレーザー共焦点顕微鏡を用いて構成するため、連続的に SHG 像を取得することができ、その連続画像から角膜のコラーゲン線維/線維束を立体構築することが可能である。SHG 顕微鏡を用いたヒト正常角膜における角膜実質コラーゲン線維束の立体構造の解析により、角膜実質浅層のコラーゲン線維束が Bowman 膜に接着する網目状構造を呈することが明らかとなった。ヒトで観察されるこの Bowman 膜に接着する線維束 (sutural lamellae) は、Bowman 膜直下で広がり、約 19 度の角度を有し、実質中層に向かうにつれて角度が徐々に緩徐になっていた。Sutural lamellae の構造が角膜の前面形状に関与するという仮説のもと、SHG 顕微鏡を用いて円錐角膜のコラーゲン線維束の構造評価を行うと、Bowman 膜が破綻し角膜が菲薄化している部分では sutural lamellae 構造が破壊されてい

ること、また、Bowman 膜および角膜厚が正常である部位においても sutural lamellae 構造は正常に比べて不均一・低密度になっていることが明らかとなった。さらに、水疱性角膜症を代表とする角膜実質浮腫眼におけるコラーゲン線維・線維束構造を SHG 顕微鏡を用いて観察すると、sutural lamellae 構造は正常角膜と同様に保たれること、一方では上皮下に異常な SHG 信号として検出される線維性組織が形成されること、この上皮下線維性組織の形成時期は臨床的実質浮腫発生後 12 か月以降に現れ始めることが明らかとなった。SHG を正常角膜および疾患角膜のコラーゲン線維/線維束の構造解析に応用することにより、角膜の形状維持機構や角膜疾患の病態理解に有用な情報を得ることができる。(日眼会誌 115 : 1025—1035, 2011)

キーワード：角膜実質，コラーゲン，第二次高調波発生，円錐角膜，水疱性角膜症

A Review

Structural Analysis of Normal Corneas and Diseased Corneas
by Applying Second Harmonic Generation

Naoyuki Morishige

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

Abstract

We have established a second harmonic generation (SHG) microscopy system for imaging of the human cornea with a mode-locked femtosecond laser and a laser confocal microscope. This SHG microscopy system has allowed us to scan corneal tissue noninvasively *ex vivo* and to obtain three-dimensional images of corneal collagen lamellae. Such three-dimensional imaging of the normal anterior cornea revealed that collagen lamellae at the anterior stroma are inter-

woven and adhere to Bowman membrane with these adherent lamellae being designated "sutural lamellae." Sutural lamellae adhere to Bowman membrane at an angle of approximately 19 degrees, whereas the angle of lamellae in the mid-stroma relative to Bowman membrane is smaller. We hypothesize that the structural unit consisting of both Bowman membrane and the sutural lamellae contributes to the rigidity and anterior curvature of the cornea. SHG

別刷請求先：755-8505 宇部市南小串 1-1-1 山口大学大学院医学系研究科眼科学 森重 直行
(平成 23 年 3 月 29 日受付，平成 23 年 6 月 15 日改訂受理) E-mail : morishig@yamaguchi-u.ac.jp

Reprint requests to : Naoyuki Morishige, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755-8505, Japan

(Received March 29, 2011 and accepted in revised form June 15, 2011)

imaging of keratoconic corneas revealed an either abnormal or a total lack of structure of the sutural lamellae, suggesting that this abnormality might be related to that of the corneal anterior curvature in such corneas. Furthermore, SHG imaging of corneas affected by stromal edema showed that the structure of the sutural lamellae was maintained, although abnormal collagen signals both above and below Bowman membrane were detected in corneas affected by clinical stromal edema for more than 12 months. SHG imaging of the structure of collagen

lamellae in normal and diseased corneas thus has the potential to provide insight both into the mechanism for maintenance of corneal curvature as well as into the pathophysiology of corneal diseases.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 115 : 1025—1035, 2011)

Key words : Corneal stroma, Collagen, Second harmonic generation, Keratoconus, Bullous keratopathy

I 緒 言

ヒト角膜は、上皮層、Bowman膜、実質層、Descemet膜、内皮の5層の単純な構造から構成される組織であり、角膜が透明であるためには、その単純かつ整然とした構造が維持されていることが重要である。角膜実質は角膜の厚さの約90%を占める部分であり、角膜実質細胞、少数の免疫細胞、神経線維以外はコラーゲンを中心とする細胞外マトリックスにより構成されている(図1)。コラーゲン分子は三本鎖らせん構造をつくっており、これらのコラーゲン分子が集合してコラーゲン原線維(fibril)を形成する。このコラーゲン原線維がさらに集合してコラーゲン線維(fiber)を形成している。角膜実質内ではこの同じ方向性を有するコラーゲン線維によ

り、コラーゲン線維の束であるコラーゲン線維束(lamellae)を形成する。その線維束は、実質浅層では厚さ0.2~1.2 μ m、幅0.5~30 μ mであるのに対し、実質深層では厚さ1.0~2.5 μ m、幅100~200 μ mとその構造が変化していくことが知られている¹⁾。角膜の体積の大部分を角膜実質が占め、実質の大部分はこのコラーゲン線維束により形成されている。したがって、正常眼や疾患眼におけるコラーゲン線維束の構造解析は、角膜の生理機構の理解や疾患の病態生理の解明に必要である。

II 第二次高調波発生とコラーゲン線維・線維束の立体構造評価

第二次高調波発生(second harmonic generation : SHG)は、非線形光学系と呼ばれる光学系の一つであり、金属

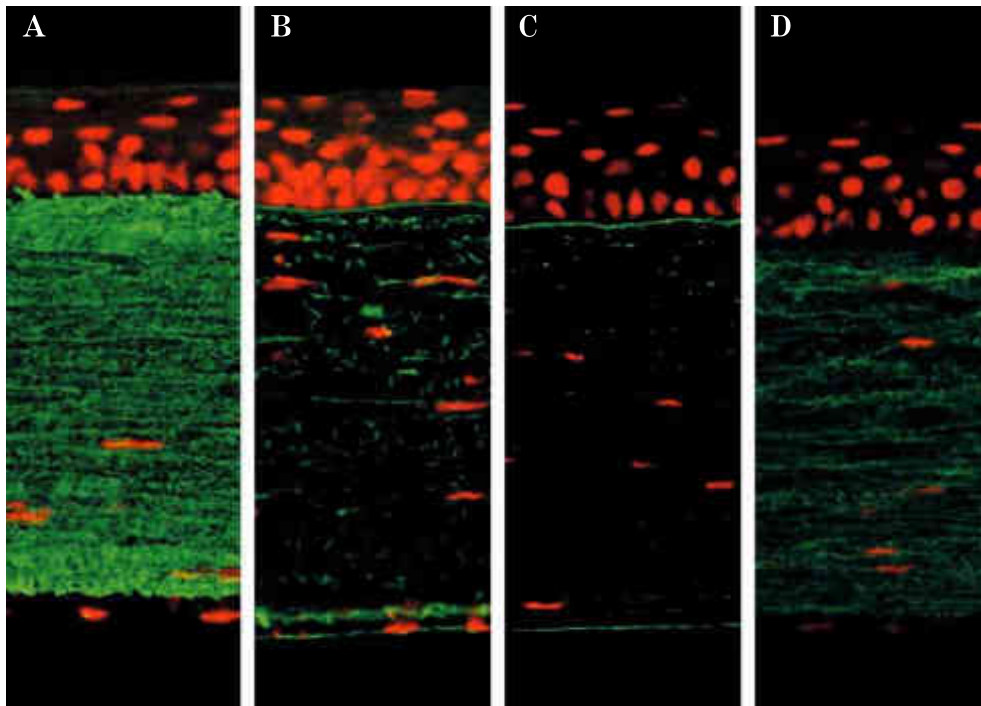


図1 角膜実質を構成する細胞外マトリックス。

A : I型コラーゲン, B : IV型コラーゲン, C : ラミニン, D : テネイシン. 緑はそれぞれの蛋白質, 赤は核. 検体は正常ラット角膜.

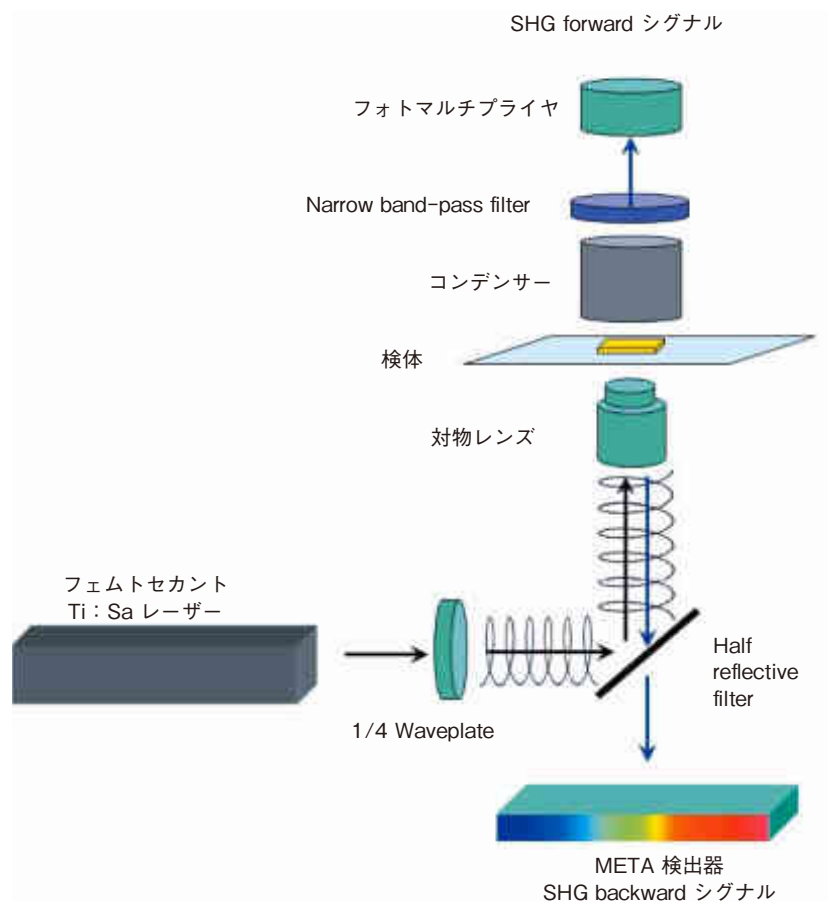


図 2 第二次高調波発生(SHG)顕微鏡の構成.

今回の研究では、レーザー共焦点顕微鏡に Carl Zeiss Microimaging 社の LSM510 META を、レーザーには、Coherent 社の mode-locked Titanium : Sapphire Laser の Chameleon を用いた。

の表面解析の手法としてこれまで用いられてきた。SHG は、“非点対称で極性を有する分子に二つの光子が衝突すると、エネルギーの喪失なしに半分の波長の一つの光子に変換される現象”である²⁾³⁾。生体内に存在する分子で SHG を発生する分子条件を満たすものはコラーゲン、ミオシン、チューブリンなどと限られている。角膜実質では、極性すなわち方向性を有したコラーゲン分子が線維および線維束を形成しており、その量もミオシン・チューブリンに比較して極端に多い。したがって、角膜から発生する SHG 信号は、コラーゲンの線維・線維束由来のものであると考えられる。

Ⅲ SHG 顕微鏡の構成

SHG の発生および観察には、フェムトセカントレーザー発生装置を備えたレーザー共焦点顕微鏡を用いる(図 2)。SHG の発生には、二つの光子を同時に一つの分子に衝突させる必要があるため、光子の密度を上げるために高頻度でレーザーを照射できるフェムト秒レーザー装置が必須である。また、レーザー照射平面を変化させることで異なる部位からの SHG 信号の採取が可能であり、この照射平面を移動させるためにレーザー共焦点顕微鏡

を用い、スキャンを行う。検体の用意はホルマリン固定された角膜組織を約 2 mm×2 mm の角膜ブロックとして切り出すだけであり、薄切切片を作製しないため、角膜の立体構造を破壊せず観察できる。観察範囲は顕微鏡の設定により変更することが可能であるが、40 倍の対物レンズを用いても 200×200 μm 以上の範囲を観察することができる。この SHG 顕微鏡システムを用いることにより、SHG 信号の連続撮影が可能となり、採取された連続画像から三次元立体構造を再構築できる(図 3)。立体構築像は、観察範囲とスキャン深度で決定される立方体となる。この立体構築された再構築像を側面から観察すると、観察範囲幅すなわち 200 μm 以上の幅を有する切片像として観察評価できる。広範囲を観察することが可能である SHG 立体構築像は、コラーゲン線維・線維束の構造および異常構造物の検出感度の高い評価系であるともいえる。

Ⅳ 正常角膜のコラーゲン線維束構造の解析

正常ヒト角膜の前額断 SHG 信号を図 4 に示す⁴⁾。ヒト角膜実質浅層由来の SHG 信号からは、線維束の長さが短く、幅も狭いのが分かる(図 4 A)。実質中層に至ると、

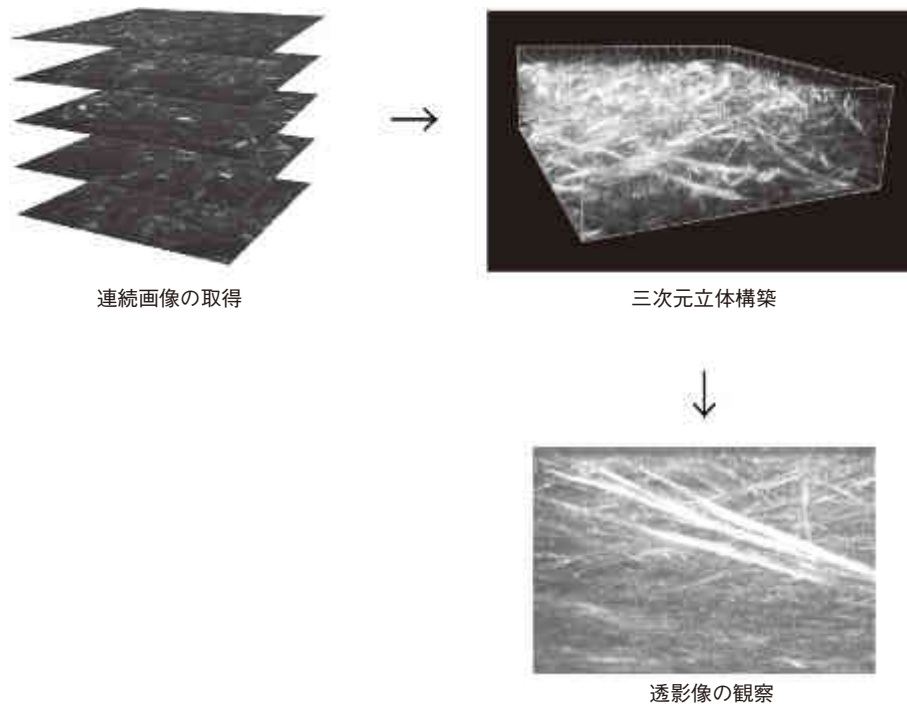


図 3 SHG 連続撮影の立体構築.

角膜をスキャンして得られた連続 SHG 画像からコラーゲン線維束構造を立体再構築する。あらゆる方向から観察可能であるが、側面から観察することで広範囲の観察が可能で、病変の検出感度が上がる。

線維の長さは長くなり、線維束の幅も広がる(図 4B)。実質深層に至ると、コラーゲン線維束の長さはさらに長くなり幅も広がる(図 4C)。SHG 信号は、多光子励起の原理で焦点面に集約された光子がコラーゲンに衝突し SHG を発生するため、SHG 信号像はきわめて薄い光学切片から生じたものと考えられる。したがって、SHG 信号の平面に含まれるコラーゲン線維の長さが短いということは、その平面に対して角度を有していることとなり、逆に SHG 信号平面に長いコラーゲン線維が含まれるということはその平面に平行に近い角度を有していることとなる。SHG 連続画像を再構築すると、角膜実質浅層に Bowman 膜に対して斜めの角度を有するコラーゲン線維束(transverse lamellae: TL, 図 5 A, 矢印)を多数認め、中層には重なり合いながらも Bowman 膜に平行に近づく線維束(interwoven lamellae: IL)へと変化し、さらに実質深層では、Bowman 膜や Descemet 膜に平行な(orthogonal lamellae: OL)へと変化した。強拡大で観察すると、実質浅層に存在するコラーゲン線維束 TL は無数にかつ均一に存在していた(図 5B)。細胞骨格・核染色を同時に行い、上皮細胞層直下の均一無構造の Bowman 膜を明瞭にすると、実質浅層のコラーゲン線維束は Bowman 膜に接着することが明らかとなった(図 5C)。これらの観察から、角膜実質浅層のコラーゲン線維束は Bowman 膜を“縫う”様に存在することが明らかとなり、我々は当初 TL と呼称したコラーゲン線維束のうち、ヒトで顕著に観察できる構造を“sutural lamel-

lae “と呼称することとした^{4)~6)}。Sutural lamellae は角膜実質内に存在するコラーゲン線維束の中でも、①実質浅層にのみみられる構造である、②角膜実質に存在するコラーゲン線維束の中で最も Bowman 膜に対して角度を有している、という点などが他のコラーゲン線維束と異なっていた。そこで、sutural lamellae の解剖学的特徴を解明すべく、正常角膜のコラーゲン線維束の構造解析を行った。海外からの提供角膜を用いて行った角膜内皮移植(Descemet's striping automated endothelial keratoplasty: DSAEK)時に得られる正常ヒト角膜実質浅層を採取し、SHG 顕微鏡で観察した。正常ヒト角膜 27 眼の解析から、sutural lamellae は Bowman 膜に $19.2 \pm 4.3^\circ$ (平均値土標準偏差)で接着し、実質中層に向かうにつれてその角度が緩やかになる [$9.1 \pm 2.9^\circ$ (深さ $50 \mu\text{m}$), $6.9 \pm 2.1^\circ$ (深さ $100 \mu\text{m}$)、図 6]。また、sutural lamellae の Bowman 膜への接着部位幅は $13.1 \mu\text{m}$ であるのに対し、直下 $30 \mu\text{m}$ の深さでは $7.1 \mu\text{m}$ まで狭小化すること、sutural lamellae は Bowman 膜 1mm^2 に約 910 本接着していることが明らかとなった⁶⁾。これらの測定から、sutural lamellae は、Bowman 膜に対して一定の角度をもって広がって接着し、直下で細くなり実質深層に向かっていく線維束であるという特徴を有しているといえる(図 7)。正常角膜の sutural lamellae の分布や形態を、角膜の部位(中心部、上下方、鼻耳側)で検討を行ったが、明らかな差異を検出することができなかった(未発表データ)。この正常角膜を対象とした研究により、

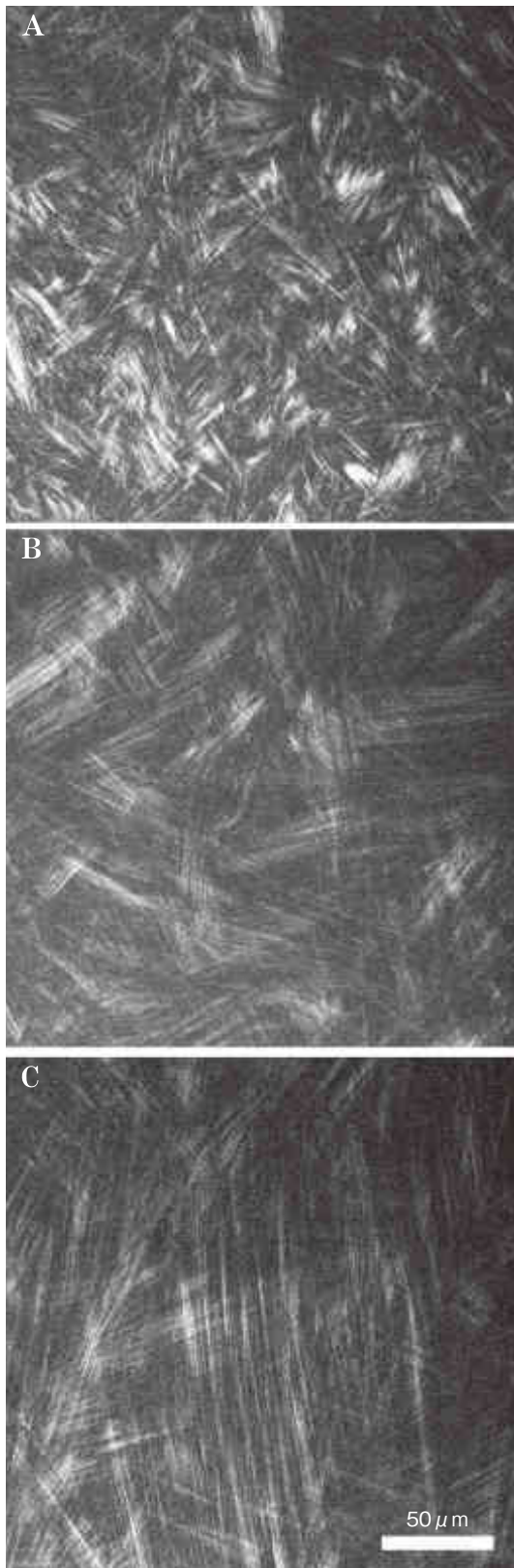


図 4 正常ヒト角膜実質の SHG 像.

A: 実質浅層, B: 実質中層, C: 実質深層. コラーゲン線維/線維束の形態が深さによって異なっているのが分かる.

(文献 4 より許可を得て転載)

角膜実質浅層のコラーゲン線維束は、線維構造による水平方向の剛性だけでなく、線維束の織り目状構造による前後方向の剛性を有することが示唆された。このことから、sutural lamellae は Bowman 膜と一体となり角膜実質浅層で三次元的な構造単位を形成し、角膜の剛性維持や前面形状維持に関与していると考えられる。

V 疾患角膜のコラーゲン線維束の構造解析

円錐角膜は、角膜前面形状異常を来す疾患の代表である。これまでの形態学的評価では、コラーゲン原線維やコラーゲン線維の構造異常が電子顕微鏡を用いて検出されてきた^{7,8)}が、電子顕微鏡では観察範囲が狭く組織としてのコラーゲン線維束の立体構造の評価ができなかった。山口大学医学部附属病院倫理委員会および Internal review board of University of California, Irvine Medical Center の承認のもと、円錐角膜検体 13 眼を SHG を用いて観察し、その三次元構造を評価した。円錐角膜では Bowman 膜が破綻することがあることが知られており、Bowman 膜の構造と Bowman 膜と構造単位を形成する sutural lamellae の構造に着目した。まず、Bowman 膜の破綻していない部位の sutural lamellae を観察すると、Bowman 膜は均一無構造の正常構造を維持しているものの、Bowman 膜に接着する sutural lamellae は短いものが多く、また正常角膜と比較して密度が不均一であった(図 8 A)。また、円錐角膜検体のうち Bowman 膜が破綻していた部位では、Bowman 膜の連続性の途切れる破綻部位の直下で実質中層に向かう sutural lamellae 構造がみられなかった⁹⁾(図 8 B)。円錐角膜眼では、Bowman 膜が正常な部位でも sutural lamellae 構造に異常があること、また円錐部分である Bowman 膜破綻部位では sutural lamellae 構造がみられないことが明らかとなった。正常角膜の検討でも、中央部、中間周辺部、周辺部の sutural lamellae 構造に顕著な差異はみられなかった(未発表データ)ことから、同一角膜内における sutural lamellae 構造の差異は、円錐角膜という疾患に特徴的な所見と考えられる。Sutural lamellae 構造は角膜実質の浅層すなわち前方に存在し角膜全体の剛性維持に関与していると考えられ、円錐角膜における角膜の前方突出にはこの sutural lamellae の破綻が関与している可能性が示唆された。

次いで、水疱性角膜症の角膜実質の構造に着目した。近年、水疱性角膜症に対する外科的療法は、全層角膜移植から急速に DSAEK を中心とする内皮移植へと変遷してきている。内皮移植は、内皮細胞層を水疱性角膜症眼へと移植する方法であり、実質浮腫に陥っていた患者角膜実質は切除されず術後も存在する。したがって、水疱性角膜症眼において角膜実質は実質浮腫が消失すれば健常で透明であるということが視力回復の大前提となる。これまで、免疫組織学的な検討から、水疱性角膜症眼の

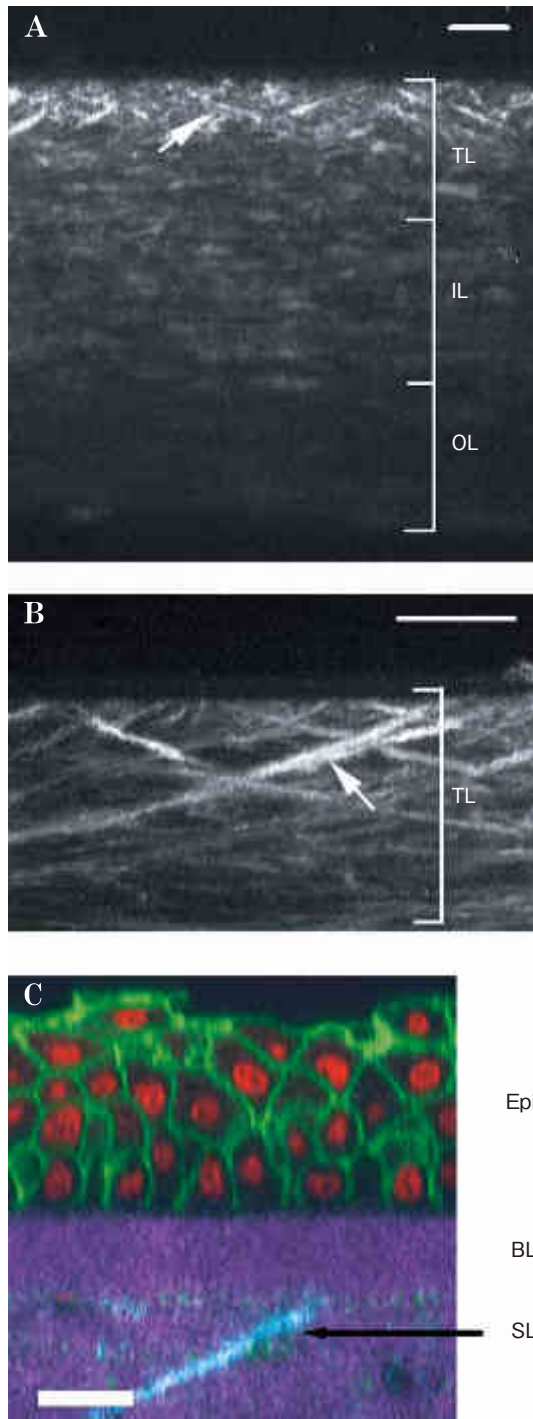


図 5 正常ヒト角膜コラーゲン線維束の立体構築像。
 A：弱拡大(TL：transverse lamellae, IL：interwoven lamellae, OL：orthogonal lamellae), B：強拡大(TL：transverse lamellae), C：細胞骨格・核染色との合成。
 緑：アクチン, 赤：核, シアン：SHG forward シグナル, マゼンダ：SHG backward シグナル。実質浅層に transverse lamellae (sutural lamellae：SL) が均一高密度に存在し, Bowman 膜(BL)に接着しているのが分かる。
 (文献 4 より許可を得て転載)

角膜実質において, 異常な細胞外マトリックスの蓄積がみられることが報告されていた^{10)~13)}。水疱性角膜症に陥った角膜実質のコラーゲン線維束構造が正常であるのか,

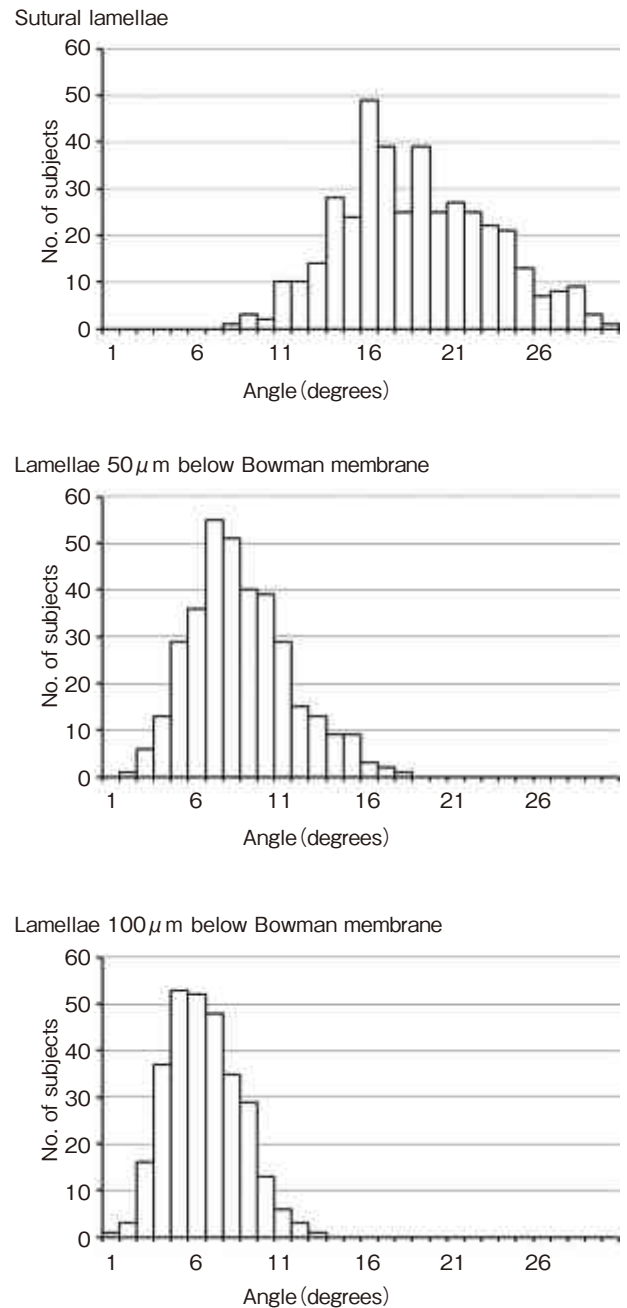


図 6 Sutural lamellae の Bowman 膜に対する角度分布。
 Bowman 膜直下から実質中層に向かうにつれて, 度数分布のピークが高角度から低角度へ移動するのが分かる。
 (文献 6 より許可を得て転載のうえ改変)

水疱性角膜症にみられる異常な細胞外マトリックスの蓄積がどのように生じるのかを, SHG を検出することにより特異的にかつ立体的に評価した。水疱性角膜症, 移植片不全および Fuchs 角膜内皮ジストロフィにより不可逆性角膜実質浮腫を来した眼に対し全層角膜移植を行い, 得られた検体について SHG 顕微鏡を用いてその立体構造を評価した。実質浮腫眼の SHG 信号を採取し立体構築を行うと, すべての検体において正常角膜と同様に,

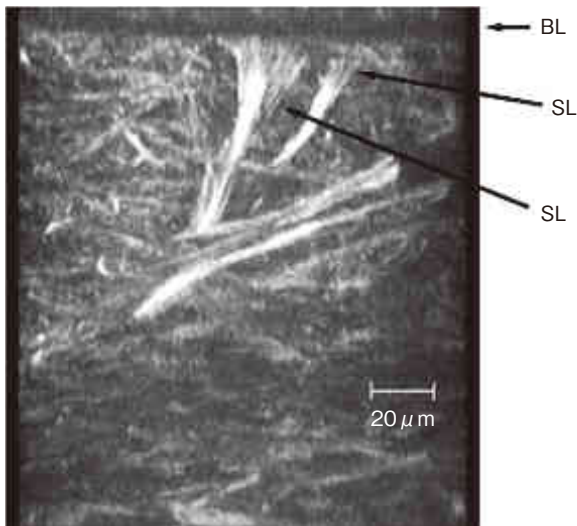


図 7 Sutural lamellae の代表像。

Sutural lamellae (SL) は Bowman 膜 (BL) に広がって接着し、直下で細くなり、いくつもの線維束が束となって実質中層へ向かう。

均一無構造な Bowman 膜に接着する sutural lamellae の認められる構造が観察された (図 9 A)。しかしながら、Bowman 膜自体に SHG 信号を認めるもの (図 9 B) や、Bowman 膜上皮側に異常な SHG 信号陽性構造を認めるものも観察された¹⁴⁾ (図 9 C)。これらの異常構造は、コラーゲン由来の信号であり、その存在部位からこれまで報告されている上皮下線維性組織形成 (subepithelial fibrosis)¹⁵⁾ であると考えられた。この上皮下線維性組織形成を示す SHG 信号はすべての症例に観察されるわけではなく、比較的実質浮腫期間の長い検体にみられる傾向にあった。そこで、不可逆性角膜実質浮腫を来していた検体を上皮下線維性組織形成の有無で分類し、その臨床的角膜実質浮腫期間と対比させた。角膜実質浮腫期間の短い検体には上皮下線維性組織形成がみられないのに対し、角膜実質浮腫期間が 12 か月を過ぎる検体から上皮下線維性組織形成が観察されるようになった¹⁴⁾ (図 9 D)。同一の検体で、細胞骨格・核染色を行い、角膜実質細胞の形態も観察評価した。角膜実質浮腫眼において、正常角膜にみられる星紡状の角膜実質細胞様形態を示すものと、アクチンフィラメント強陽性となる紡錘状の角膜線維芽細胞 (fibroblast) 様形態を示すものが観察された。これら角膜実質細胞の表現型と角膜実質浮腫期間とを比較評価すると、上皮下線維性組織形成と同様に、角膜実質浮腫期間の短い検体には角膜線維芽細胞様形態を示す角膜実質細胞がみられないのに対し、角膜実質浮腫期間が 12 か月を過ぎる検体から角膜線維芽細胞様形態を示す角膜実質細胞が観察されるようになった¹⁴⁾ (図 10)。これら上皮下線維性組織形成および角膜線維芽細胞様角膜実質細胞の評価に加え、対象を水疱性角膜症に限定して角膜実質の瘢痕形成時に発現する筋線維芽

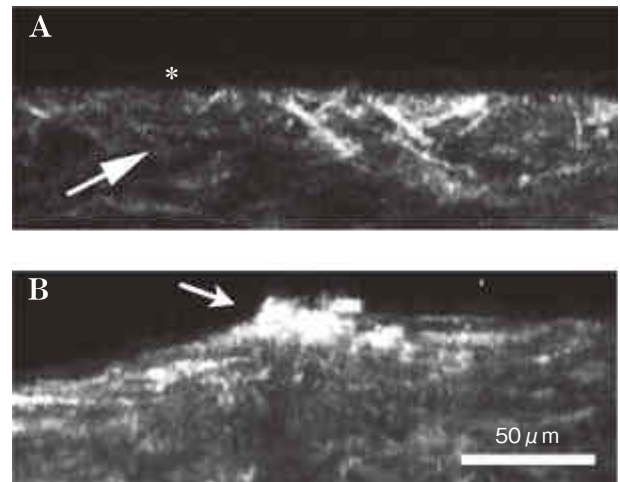


図 8 円錐角膜眼由来 SHG 信号の立体構築像。

A : Bowman 膜正常部位 (* : Bowman 膜, 矢印 : sutural lamellae 分布密度の低い部位)。B : Bowman 膜破綻部位 (矢印 : Bowman 膜が破綻しており、同部位に SHG 信号が集積している。異常なコラーゲン線維の集積を示唆している)。

(文献 9 より許可を得て転載)

細胞の有無も併せて評価すると、同様に角膜実質浮腫期間が 12 か月を過ぎる検体から筋線維芽細胞が観察されるようになった¹⁶⁾。これら上皮下線維性組織形成、角膜線維芽細胞、筋線維芽細胞の出現を、実質浮腫期間 12 か月で分けてその出現・発現の有無を比較評価すると、いずれも実質浮腫発生後 12 か月以上の群で観察頻度が有意に増加することが明らかとなった。これらのことから、水疱性角膜症は実質浮腫が生じてからの期間依存性に病理組織学変化が生じること、すなわち実質浮腫期間依存性の進行性疾患であると考えられた。

VI 考 按

一連の SHG を用いた研究で明らかとなった正常角膜および疾患角膜の三次元構造の模式図を示す (図 11)。正常角膜の実質内では、コラーゲン線維束は層状に重なっているが、実質でも浅層では織り重なって Bowman 膜に接着する sutural lamellae 構造を形成している。この sutural lamellae 構造が角膜の前後方向の剛性を強化し角膜の前面形状形成に関与すると考えられる。これまでの組織学的な観察から、角膜実質浅層のコラーゲン線維・線維束が織り目状構造を呈することは知られていた¹⁷⁾¹⁸⁾。この角膜実質浅層にみられるような構造はサメ角膜における観察でもみられ、水中で生息するサメ角膜が実質浮腫を来さないことの根拠とされている¹⁹⁾。また、ヒト角膜実質浮腫眼を組織学的に観察すると、Bowman 膜から約 100~120 μm の部分の角膜実質では、角膜厚が増加せず、それより深層の角膜実質厚が増加するということが報告されている²⁰⁾。これらの知見は、臨床的に、角膜実質浮腫眼での Descemet 膜皺襞として観

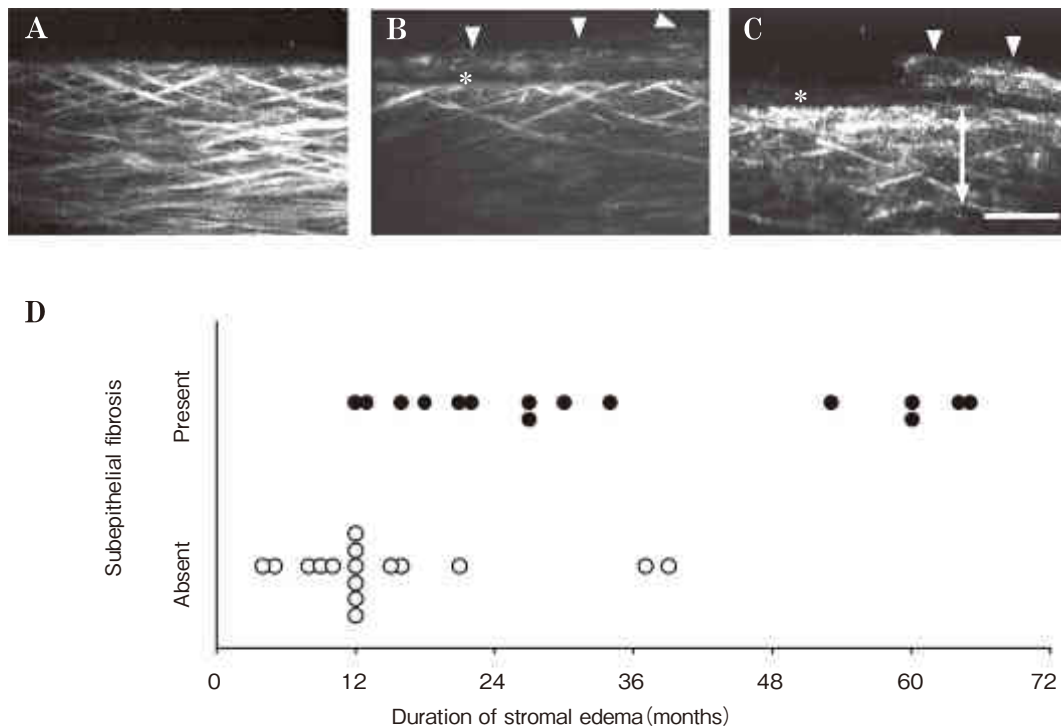


図 9 角膜実質浮腫眼におけるコラーゲン線維束構造と上皮下線維性組織形成(subepithelial fibrosis), および実質浮腫期間との関連.

A: 実質浮腫期間 12 か月, B: 実質浮腫期間 22 か月(*: Bowman 膜, 矢頭: Bowman 膜上の異常コラーゲン蓄積を示す SHG 信号), C: 実質浮腫期間 27 か月(*: Bowman 膜, 矢頭: Bowman 膜上の異常コラーゲン蓄積を示す SHG 信号, 両矢: 実質浅層にも異常コラーゲン線維の蓄積がみられる). バーは 50 μm . D: 角膜実質浮腫期間と上皮下線維性組織形成の有無との関連. 横軸は角膜実質浮腫期間. 実質浮腫期間が 12 か月を過ぎる検体から上皮下線維性組織形成が出現している.

(文献 14 より許可を得て転載)

察することができる. 角膜実質浮腫眼では, 角膜が浮腫により肥厚するが, 角膜実質浅層は強靱なコラーゲン線維束構造のため形を変えず, 浮腫による肥厚は内皮側に起こる. このため, 角膜内皮面の曲率半径は小さくなるため, 内皮面面積は小さくなる. しかしながら Descemet 膜面積は変わらないので, 余剰となった Descemet 膜の皺が実質浮腫眼における Descemet 膜の皺襞として観察される. 実質浮腫状である DSAEK 術前と比較して, 浮腫が消失した DSAEK 術後で有意な角膜前面形状の変化がみられない²¹⁾ことから, 実質浮腫眼で浮腫による角膜の肥厚が角膜上皮面方向に起こらないことをうかがい知ることができる. このように, 角膜実質のコラーゲン線維束が角膜の前後方向に織目状構造を形成していることによって, 角膜前面の強固な立体構造が保持されていると考えられる. 我々の研究は, これまで提唱されてきた角膜実質浅層の剛性を, コラーゲン線維束の立体構造から説明しているものと考えている.

角膜の前面形状の異常を来す円錐角膜では, 正常角膜で観察される sutural lamellae 構造に異常を来しており, sutural lamellae 構造の不均一化や低密度化, sutural lamellae 構造の喪失などが認められた. 円錐角膜では,

Bowman 膜および Descemet 膜の破綻を来すことが知られている. Descemet 膜の破綻は急性水腫として臨床的に顕著な症状として観察されるため認識しやすいが, Bowman 膜の破綻は急激な臨床所見の変化として現れにくいいため, 臨床的には重要視されていない傾向にあると思われる. しかしながら, 我々の観察では, Bowman 膜が破綻している部位ではコラーゲン線維束構造の喪失という顕著な構造異常を来していること, またこの Bowman 膜が破綻している部位は円錐部分にみられたことから, Bowman 膜の変性・破綻は円錐角膜の重要な病態生理であると考えられる. 円錐角膜眼における sutural lamellae 構造の異常は, 円錐角膜の形状変化の結果としてこのような構造になっているのか, 構造変化が形態変化の原因となっているのか, 証明することはきわめて困難である. また, 円錐角膜という疾患において, なぜこのようにコラーゲン線維束構造が変化していくのか, どのように変化していくのかは不明である. コラーゲン線維束構造変化のメカニズムの解明は今後の研究課題であるが, 角膜実質浅層すなわち前方で三次元的に立体構造を形成していた Bowman 膜-sutural lamellae 構造の破綻と円錐角膜眼における角膜の前方突出には一定の関係

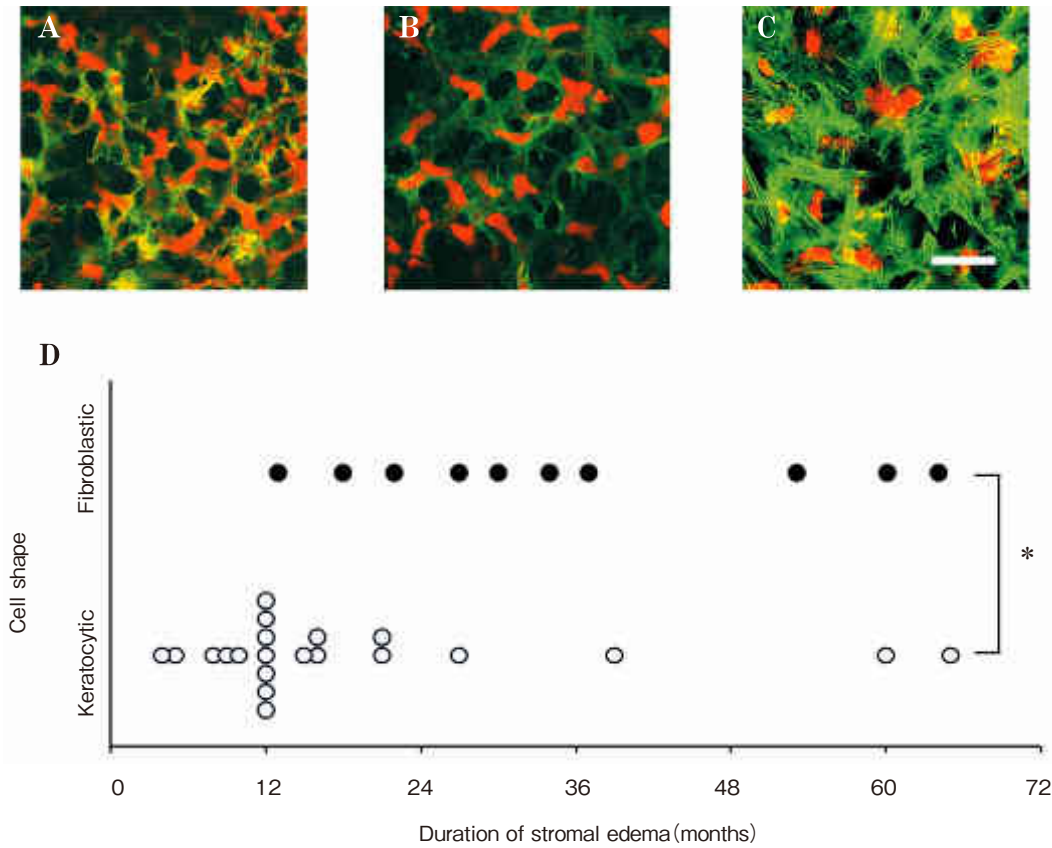


図 10 角膜実質浮腫眼における角膜実質細胞の形態評価.

A：正常角膜における角膜実質細胞. B：実質浮腫期間 12 か月の実質細胞. 角膜実質細胞形態を示している. C：実質浮腫期間 27 か月. 実質細胞がアクチンを強発現し紡錘形に変化し, 角膜線維芽細胞 (fibroblast) の形態を示している. バーは 50 μm . D：角膜実質浮腫期間と角膜線維芽細胞発現の有無との関連. 横軸は角膜実質浮腫期間. 実質浮腫期間が 12 か月を過ぎる検体から角膜線維芽細胞が出現している. (文献 14 より許可を得て転載)

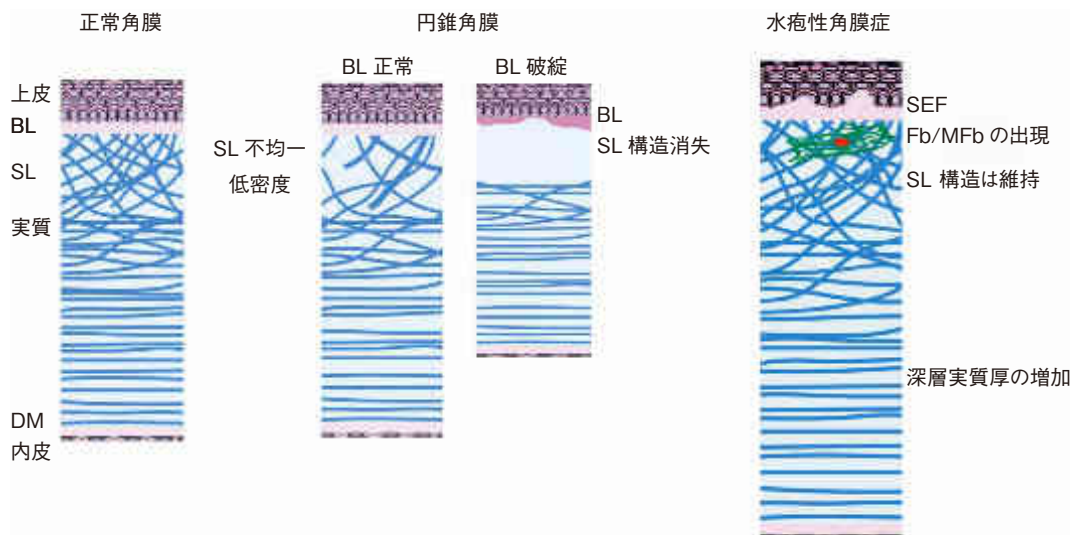


図 11 SHG で明らかとなった角膜実質コラーゲン線維束構造.

正常角膜では, 角膜実質浅層に Bowman 膜 (BL) に角度をもって接着するコラーゲン線維束 sutural lamellae (SL) が存在する. 実質中層から深層にかけては Bowman 膜に対し平行に近くなる. DM: Descemet 膜. 円錐角膜眼では, sutural lamellae 構造が低密度になったり喪失したりするなどの構造異常を来す. 角膜実質浮腫眼では, sutural lamellae 構造は維持されるものの, Bowman 膜前後にコラーゲン線維の異常集積がみられる. SEF: 上皮下線維性混濁, Fb/MFb: 線維芽細胞/筋線維芽細胞.

(文献 5 より許可を得て転載のうえ改変)

がある可能性があり、将来的には、角膜形状解析の結果と sutural lamellae 構造の特徴を比較検討する必要があるのではないかと考えている。

水疱性角膜症では、実質浅層の sutural lamellae 構造は維持されており、角膜全体のコラーゲン線維束構造の破壊がなく、角膜内皮移植術後の角膜形状を十分維持できる剛性を有していることが示された。一方では、Bowman 膜前後において上皮下線維性組織形成や線維芽細胞・筋線維芽細胞などの不可逆性の病理組織学的変化を来していること、またその変化は実質浮腫が現れてからの期間に依存していることが明らかとなった。DSAEK をはじめとする角膜内皮移植は近年急速に普及してきているが、DSAEK を中心とする臨床研究では術後良好な視力回復が得られることが報告されており^{21)~23)}、今後もその適応拡大が予想される。我々の研究では、水疱性角膜症において角膜実質の剛性に関与する sutural lamellae 構造が維持されている¹⁴⁾ことが示され、今後さらに拡大する内皮移植において患者角膜実質を温存し活用することの正当性を示していると考えている。一方では、水疱性角膜症は病理組織学的に進行性の疾患であり、臨床的実質浮腫期間が長期化すると病理組織学的変化が発生する¹⁴⁾¹⁶⁾傾向にあることから、透明な角膜実質を維持するためには臨床的実質浮腫が生じてからなるべく早い段階で内皮移植に踏み切る方が望ましいと考えられる。角膜実質浮腫が長期化した場合、角膜実質の不可逆的器質的変化の危険性が高まるが、角膜実質置換を第一に考えた全層角膜移植の施行には議論が残るところである。全層角膜移植では実質をすべて置換することにより患者角膜実質に残存する癍痕を除去でき角膜実質を透明化することができるが、一方で惹起不正乱視のため視力回復は内皮移植に及ばない²⁴⁾ため、内皮移植施行を否定する根拠にまではなり得ないと考えている。内皮移植が全層角膜移植と比較して良好な視力回復が得られる手術である以上、現在の角膜移植では可能な限り内皮移植の可能性を探る必要がある。角膜実質の癍痕形成が角膜実質浮腫期間に依存することを考慮すると、水疱性角膜症に対する内皮移植手術の施行時期は、浮腫に起因する癍痕形成が起こる前に行われるべきであると考えている。

SHG を用いた角膜の構造解析は、さまざまな観点から行われている。これまで提示してきた内容に加え、エキシマレーザー照射後の角膜実質の癍痕形成を、SHG を用いて形態評価したり²⁵⁾、フェムト秒レーザーを用いた角膜切開の切開面の形態評価に用いたりしている²⁶⁾。また、角膜実質の癍痕²⁷⁾や感染角膜²⁸⁾の評価や、さらには視神経乳頭の形態評価にも応用されている²⁹⁾。Hochheimer が角膜由来の SHG を報告³⁰⁾した 1982 年以降、SHG を用いて角膜構造を評価する試みは約 20 年間大きな変化をみられなかったが、実験室におけるフェムト秒レーザーを装備した多光子顕微鏡の普及により、昨今の角膜

領域における SHG をはじめとする非線形光学系の眼科領域での研究は大きな躍進を遂げたといえる^{31)~34)}。今後もさらに臨床検体の評価や生理機構や病態生理の把握に、SHG をはじめとする非線形光学系を用いた検出系が広く応用されてくるのではないかと考えている。

稿を終えるにあたり、学生時代より現在に至るまでご指導いただいております山口大学副学長 西田輝夫先生に深謝いたします。SHG の観察系の原理をご教授くださいました University of California, Irvine 教授 James V. Jester 先生、SHG 顕微鏡システムを用いた観察を全面的にご支持くださいました九州大学先端物質化学研究所教授 高原 淳先生、本論文をご高覧くださいました山口大学大学院医学系研究科眼科学教授 園田康平先生に深謝いたします。

利益相反：利益相反公表基準に該当なし

文 献

- 1) Komai Y, Ushiki T : The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 2244—2258, 1991.
- 2) Franken PA, Hill AE, Peters CW, Weinreich G : Generation of optic harmonics. *Phys Rev Lett* 7 : 118—119, 1961.
- 3) Boyd RW : Second- and Higher-Order Harmonic Generation. *Masters BR and So PTC : Biomedical nonlinear optical microscopy*. Oxford University Press, New York, 153—163, 2008.
- 4) Morishige N, Petroll WM, Nishida T, Kenney MC, Jester JV : Noninvasive corneal stromal collagen imaging using two-photon-generated second-harmonic signals. *J Cataract Refract Surg* 32 : 1784—1791, 2006.
- 5) Morishige N, Nishida T, Jester JV : Second harmonic generation for visualizing 3-dimensional structure of corneal collagen lamellae. *Cornea* 28 : S 46—S 53, 2010.
- 6) Morishige N, Takagi Y, Chikama T, Takahara A, Nishida T : Three-dimensional analysis of collagen lamellae in the anterior stroma of the human cornea visualized by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 : 911—915, 2011.
- 7) Radner W, Zehetmayer M, Skorpik C, Mallinger R : Altered organization of collagen in the apex of keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 30 : 327—332, 1998.
- 8) Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Kaiya T, Sugar J, Yue BY : Three-dimensional scanning electron microscopic study of keratoconus corneas. *Arch Ophthalmol* 116 : 62—68, 1998.

- 9) **Morishige N, Wahlert AJ, Kenney MC, Brown DJ, Kawamoto K, Chikama T, et al** : Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1087—1094, 2007.
- 10) **Kenney MC, Chwa M** : Abnormal extracellular matrix in corneas with pseudophakic bullous keratopathy. *Cornea* 9 : 115—121, 1990.
- 11) **Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y, et al** : Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 997—1007, 1996.
- 12) **Ljubimov AV, Saghizadeh M, Pytela R, Sheppard D, Kenney MC** : Increased expression of tenascin-C-binding epithelial integrins in human bullous keratopathy corneas. *J Histochem Cytochem* 49 : 1341—1350, 2001.
- 13) **Ljubimov AV, Saghizadeh M, Spirin KS, Khin HL, Lewin SL, Zardi L, et al** : Expression of tenascin-C splice variants in normal and bullous keratopathy human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1135—1142, 1998.
- 14) **Morishige N, Yamada N, Teranishi S, Chikama T, Nishida T, Takahara A** : Detection of subepithelial fibrosis associated with corneal stromal edema by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 3145—3150, 2009.
- 15) **Eagle RC, Jr., Laibson PR, Arentsen JJ** : Epithelial abnormalities in chronic corneal edema : a histopathological study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 87 : 107—119 ; discussion 119—124, 1989.
- 16) **Morishige N, Nomi N, Morita Y, Nishida T** : Immunohistofluorescence analysis of myofibroblast transdifferentiation in human corneas with bullous keratopathy. *Cornea* 30 : 1129—1134, 2011.
- 17) **Gallagher B, Maurice D** : Striations of light scattering in the corneal stroma. *J Ultrastruct Res* 61 : 100—114, 1977.
- 18) **Bron AJ** : The architecture of the corneal stroma. *Br J Ophthalmol* 85 : 379—381, 2001.
- 19) **Goldman JN, Benedek GB** : The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark. *Invest Ophthalmol* 6 : 574—600, 1967.
- 20) **Muller LJ, Pels E, Vrensen GF** : The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 85 : 437—443, 2001.
- 21) **Chen ES, Terry MA, Shamie N, Hoar KL, Friend DJ** : Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty : six-month results in a prospective study of 100 eyes. *Cornea* 27 : 514—520, 2008.
- 22) **Price MO, Giebel AW, Fairchild KM, Price FW, Jr.** : Descemet's membrane endothelial keratoplasty : prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. *Ophthalmology* 116 : 2361—2368, 2009.
- 23) **Price MO, Price FW, Jr** : Descemet's stripping with endothelial keratoplasty : comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmology* 113 : 1936—1942, 2006.
- 24) **Claesson M, Armitage WJ, Fagerholm P, Stenevi U** : Visual outcome in corneal grafts : a preliminary analysis of the Swedish Corneal Transplant Register. *Br J Ophthalmol* 86 : 174—180, 2002.
- 25) **Farid M, Morishige N, Lam L, Wahlert A, Steinert RF, Jester JV** : Detection of corneal fibrosis by imaging second harmonic-generated signals in rabbit corneas treated with mitomycin C after excimer laser surface ablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 4377—4383, 2008.
- 26) **Morishige N, Kesler-Diaz A, Wahlert AJ, Kurtz RM, Juhasz T, Sarayba M, et al** : Corneal response to femtosecond laser photodisruption in the rabbit. *Exp Eye Res* 86 : 835—843, 2008.
- 27) **Teng SW, Tan HY, Sun Y, Lin SJ, Lo W, Hsueh CM, et al** : Multiphoton fluorescence and second-harmonic-generation microscopy for imaging structural alterations in corneal scar tissue in penetrating full-thickness wound. *Arch Ophthalmol* 125 : 977—978, 2007.
- 28) **Tan HY, Sun Y, Lo W, Teng SW, Wu RJ, Jee SH, et al** : Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging infectious keratitis. *J Biomed Opt* 12 : 024013, 2007.
- 29) **Brown DJ, Morishige N, Neekhra A, Minckler DS, Jester JV** : Application of second harmonic imaging microscopy to assess structural changes in optic nerve head structure *ex vivo*. *J Biomed Opt* 12 : 024029, 2007.
- 30) **Hochheimer BF** : Second harmonic light generation in the rabbit cornea. *Appl Opt* 21 : 1516—1518, 1982.
- 31) **Stoller P, Reiser KM, Celliers PM, Rubenchik AM** : Polarization-modulated second harmonic generation in collagen. *Biophys J* 82 : 3330—3342, 2002.
- 32) **Yeh AT, Nassif N, Zoumi A, Tromberg BJ** : Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Opt Lett* 27 : 2082—2084, 2002.
- 33) **Teng SW, Tan HY, Peng JL, Lin HH, Kim KH, Lo W, et al** : Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the *ex vivo* porcine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 1216—1224, 2006.
- 34) **Aptel F, Olivier N, Deniset-Besseau A, Legeais JM, Plamann K, Schanne-Klein MC, et al** : Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51 : 2459—2465, 2010.