

角膜上皮のスペキュラーマイクロスコピー (図7, 表1)

中野 秀 樹 (筑波大学臨床医学系眼科)

要 約

ワイドフィールドスペキュラーマイクロスコピーを用いて直接接方式で正常角膜上皮細胞の形態を観察した。ヒアルロン酸ナトリウム (ヒーロン®) を仲介液として用いることにより上皮細胞の保護と安定した観察をおこない得た。角膜上皮を構成する表層細胞, 翼細胞ならびに基底細胞を形態学的に識別することが可能であった。スペキュラーマイクロスコピーで暗く見える細胞 (dark cell) の一部は最表層細胞の剝離脱落により露出した第2層の新しい細胞であると信じられる。(日眼会誌 93: 775-780, 1989)

キーワード: ワイドフィールドスペキュラーマイクロスコピー, ヒアルロン酸ナトリウム, 角膜上皮, 表層細胞, 基底細胞

Specular Microscopy of Corneal Epithelium

Hideki Nakano

Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

Abstract

Wide-field specular microscopy was used to examine the morphologic appearance of normal human corneal epithelium. A drop of sodium hyaluronate (Healon®) on the applanating cone of the microscope minimized injury to the corneal surface and enabled clear observation of the epithelial cells. Not only the details of surface cells, but also deep epithelial layers which consist of wing and basal cells were recognized in this study. Dark cells in specular microscopy, we presume, originate from young surface cells becoming exposed after desquamation of old cells. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 775-780, 1989)

Key words: Wide-field specular microscopy, Sodium hyaluronate, Corneal epithelium, Surface cells, Basal cells.

I 緒 言

スペキュラーマイクロスコピーは互いに屈折率の異なる物質の境界面で生じる鏡面反射を利用して角膜上皮細胞の形態を生体観察する装置であるが¹⁾⁻²⁾, 最近角膜上皮細胞の観察にも応用されるようになった³⁾⁻¹⁵⁾. 上皮表層細胞をスペキュラーマイクロスコピーで観察することは容易である. しかしそれより深層

の細胞 (翼細胞ならびに基底細胞) については, 互いが類似の屈折率を持つため, 細胞層間の境界面での反射が表層細胞と涙液層の境界からの反射にくらべて著しく弱く¹⁾⁸⁾, 特に正常眼では, これらの細胞を明瞭に観察することは困難とされていた⁸⁾. ただし角膜内部に光の散乱を惹起する病的所見, 例えば上皮浮腫あるいは沈着物などが存在する事により上皮深層の基底細胞を識別できることが知られている⁴⁾⁷⁾⁻⁸⁾¹³⁾⁻¹⁴⁾.

別刷請求先: 305 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系眼科 中野 秀樹
(平成元年 4月6日受付, 平成元年 6月21日改訂受理)

Reprint requests to: Hideki Nakano, M.D. Dept. of Ophthalmol., Institute of Clinical Med., Univ. of Tsukuba 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japan
(Received April 6, 1989 and accepted in revised form June 21, 1989)



図 1

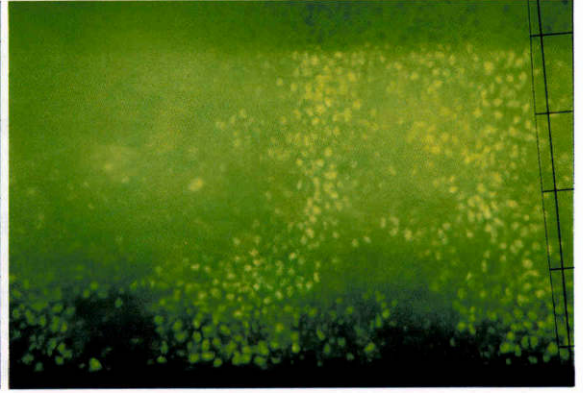


図 4



図 2

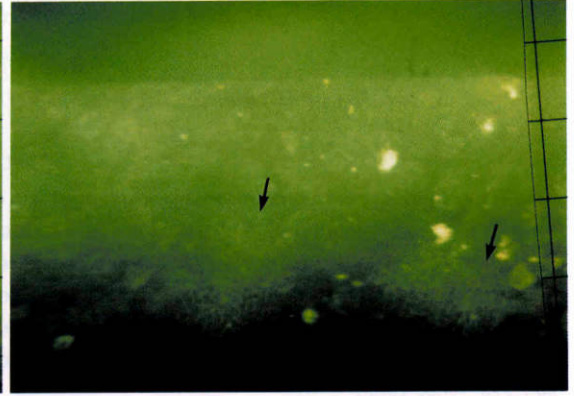


図 5

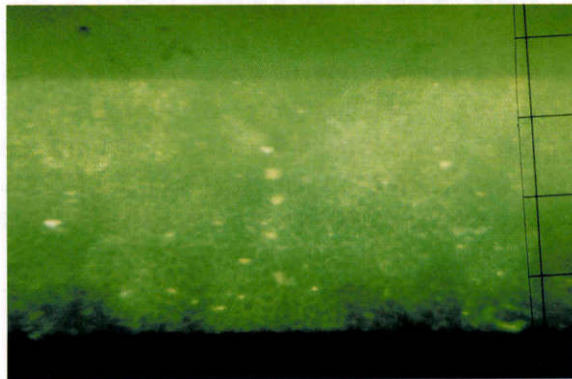


図 3

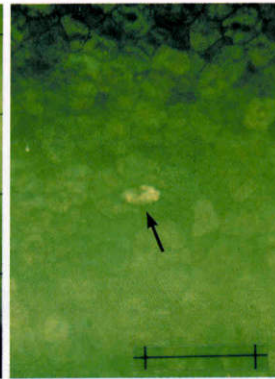


図 6



図 7

今回私は正常眼ならびに角膜沈着のある症例についてスペキュラーマイクروسコープによる角膜上皮の生体観察をおこない、表層細胞ならびに深層細胞の形態学的識別について検討したのでその結果を報告する。

II 対象と方法

25歳から65歳までの正常者10名と顆粒状角膜変性患者1名ならびにアミオダロン角膜症患者1名を対象とした。なお検査に先立ち、被検者全員に対して検査の内容と危険性について簡単に説明をおこない、同意を得た上で検査を施行した。

観察には接触型ワイドフィールドスペキュラーマイクروسコープ(甲南カメラ)を用い、検査の直前に0.4%塩酸オキシブプロカイン(ベノキシール®)を1~2滴点眼した。次に対物レンズの角膜接触面に少量のヒアルロン酸ナトリウム(ヒーロン®)を塗布した。これは角膜の保護とレンズ・角膜間の散乱光を緩衝する仲介液として用いられた¹⁴⁾。また観察中開眼器は使用せず被検者の瞬目は自由であった。なお検査の前後にスリットランプマイクروسコープによる観察をおこない角膜障害の発現の有無を確認した。

観察は表層細胞から開始し、順に深層の細胞に移行した。また異なる部位を観察する際には、対物レンズをわずかに後退させ、角膜に接触させたまま水平垂直方向に移動させた。

撮影フィルムはエクタクロームASA400(コダック)を用い、1眼につき20枚前後の写真を撮影し普通現像によりスライドを作成した。観察倍率は160倍、撮影倍率は40倍であり、原則としてグリーンフィルターを使用した。

上皮細胞の形態の検討は、スライドをプロジェクターで拡大しておこなった。またディジタイザー並び

にセルアナライザーを用い細胞面積を一画面につき40個ずつ計測し、平均細胞面積を算出した。

III 結果

今回の方法では、被検者に対しほとんど不快感を与えずに良好な条件で上皮細胞の観察ならびに写真撮影をおこなう事が可能であった。またヒーロンを対物レンズと角膜の間の仲介液として使用した結果、観察部位を変える際に対物レンズを角膜に接触させたまま水平垂直方向に移動させても上皮表層細胞の剝離は無視出来るくらい少なく、生理的に近い状態を保ちながら広い範囲の角膜上皮を12例全例について観察し得た。今回は、観察後におこなったスリットランプ検査の結果、上皮剝離の所見はいずれの被検者にも認められなかった。

最も容易に観察出来たのは最表層細胞で、従来の報告と同様に、明るさの異なる3種類の細胞即ち light, medium, dark cell が識別された(図1)。これらはいずれも6角形を基本型とするが、隣接する細胞が部分的に重なり合い、複雑な多角形の細胞境界を形成する所見も認められた。核の明瞭な最表層細胞は少なかった。Light cell は dark cell より分布密度が高く、dark cell は light cell の細胞間隙を埋めるような配列様式をとるものが多かった。Light cell の細胞境界は明瞭で計測が容易だったが、直径は20~50 μm と変動が大きかった。平均細胞面積は427~714 μm^2 で個人差は認められたものの、今回の被検者内で年齢差は見られなかった(表1)。一方 dark cell は、細胞境界が細胞の重なり合いのため不規則で不鮮明なものが多く、特に数個の細胞がかたまっ配列している場合には互いの境界を判別する事が困難であり、従って正確な細胞面積を計測するのは難しいと判断された。

- 図1 正常者(症例5, 35歳男性)の角膜上皮表層細胞。明るさの異なる細胞がモザイク様に並んでいる。核は不明瞭。スケール目盛の長さは100 μm 。
- 図2 正常者(症例7, 49歳男性)の角膜上皮中間層細胞。
- 図3 正常者(症例8, 51歳女性)の上皮基底細胞。
- 図4 アミオダロン角膜症患者(症例11, 42歳女性)の上皮基底細胞内沈着物。沈着物の大きさは10 μm を越えない。
- 図5 顆粒状角膜変性患者(症例12, 49歳女性)の基底細胞。実質内沈着物に一致した部分(矢印)のみで観察可能。
- 図6 表層細胞の連続写真の一枚目(症例7, 49歳正常男性)。反射の強い剝離寸前の細胞が中央部に認められる(矢印で示す)。
- 図7 連続写真の二枚目。図6の細胞の脱離部位に一致して、第2層の暗く見える細胞(dark cell, 矢印)が露出している。スケール目盛の長さは100 μm 。

表1 Light cell の平均細胞面積

症 例	平均細胞面積 (μm^2)	標 準 偏 差	最大細胞面積 (μm^2)	最少細胞面積 (μm^2)
1. 25 F	511	115	792	270
2. 25 M	521	105	760	349
3. 26 M	482	96	669	308
4. 29 F	427	105	745	281
5. 35 M	458	116	692	263
6. 36 M	485	85	688	291
7. 49 M	518	125	789	278
8. 51 F	515	90	712	327
9. 63 M	714	215	1204	340
10. 65 M	554	127	780	222
11. 42* F	647	235	1362	337
12. 49**F	506	104	774	288

*アミノダロン角膜症 **顆粒状角膜変性

次にマイクروسコープの焦点をわずか後方に移動させると、細胞境界は表層細胞よりやや不鮮明であるが同様に暗く見え、一方表層細胞と異なり核が明瞭で大ききの揃った小型の多角形細胞が密集して配列しているのが観察された。直径は $15\mu\text{m}$ ~ $20\mu\text{m}$ であり、表層細胞と基底細胞の中間に位置する翼細胞に相当するものと思われた(図2)。

一方焦点を翼細胞層よりやや後方に移動させると正常者10名中1名(症例8)のみにおいて不明瞭ながら基底細胞を観察する事が可能であった。基底細胞は直径が約 $10\mu\text{m}$ と上皮細胞中最も小さく、周囲が明るく周辺部が暗く見え、蜂巢状を呈していた(図3)。基底細胞内に沈着物が見られるアミノダロン角膜症(図4)では、基底細胞の境界を直接観察することは出来なかったが、細胞内沈着物を介して基底細胞が密集して配列する状況を伺い知ることが出来た。また実質内に沈着を生じる顆粒状角膜変性の患者(図5)では、部分的に基底細胞の大きさや輪廓を観察出来た。

IV 考 按

接触型スペキュラーマイクروسコープで角膜上皮細胞を観察する際の障害は、涙液・対物レンズ間の境界面からの反射が、角膜・涙液間の反射よりはるかに強い事で、これは対物レンズ(ガラス)の高い屈折率に起因するものであった¹⁾。このためワイドコンバータを対物レンズ先端部に装着し、中に満たした生理的食塩水またはコンタクトレンズ装着液を利用して反射の軽減をはかる方法が用いられた^{3)~5)9)}。しかし生理的食塩水はコンバータから流出しやすく、一方粘着性の強

いコンタクトレンズ装着液は気泡が入りやすく観察の支障となる欠点があった⁹⁾。幸い最近対物レンズに改良がおこなわれ、ガラス(屈折率1.516)、ホタル石 CaF_2 (屈折率1.44)、沸化マグネシウム MgF_2 (屈折率1.38)の多層構造²⁾となったため涙液・対物レンズ間における反射は著しく減少し、ワイドコンバータを用いなくても角膜上皮を観察することが可能になった¹⁴⁾¹⁵⁾。

対物レンズを直接角膜に接触させた場合、観察中に上皮細胞が器械的損傷を受け観察が困難になる可能性がある。我々は角膜上皮の保護を目的としてヒーロンを使用した³⁾、ヒーロンは滅菌製剤で高い純度と高い粘弾性を持ち、レンズに塗布してもコンタクトレンズ装着液のように滴下せず取扱いが容易であった¹⁴⁾。また観察中に生じた表層細胞の剥離は予想よりはるかに少なく、観察後のスリットランプ検査でも明らかな角膜障害の発生が認められなかった事から、今回の様な角膜上皮障害のない症例だけでなく上皮障害のある症例についても適用出来る方法と思われる。

直接接触方式のもう一つの欠点は、ワイドコンバータを用いる方法にくらべて対物レンズによる角膜の圧平が不均一になり易く、涙液層が安定せず視野全体にわたって鮮明な映像が得難いことである。また結膜分泌物の混入が視界をさまたげることもある。親水性ソフトコンタクトレンズの使用²⁾⁶⁾⁸⁾¹⁵⁾は確かに角膜上皮の保護と涙液層の安定の面で効果的な方法と思われるが、コンタクトレンズが角膜とレンズの間に介在するため角膜に対する圧平を直接接触方式ほど微妙に調節することは困難であり、今回の目的とした上皮深層の

細胞を観察することは難しいと考えられる。一方ヒーロンを用いる方法は、コンタクトレンズ法で必要とされる洗眼も不要で明瞭な視界を確保する効果があった。これらの結果からヒーロンは角膜上皮の観察には好適な補助材料と言える。

ここでヒーロンの光学系に対する影響について考えてみたい。スペキュラーマイクروسコープの原理は屈折率の異なる物質の境界面からの鏡面反射であるが、その反射率 R は次の式で表される¹⁾。

$$R = [(n_1 - n_2) / (n_1 + n_2)]^2$$

但し n_1 , n_2 は 2 つの物質の屈折率である。ヒーロンは水とほぼ同じ屈折率 (1.333)¹⁶⁾ を持つ物質で、涙液の屈折率 (1.336) とも極めて近い。だからヒーロン+涙液・角膜間の反射率はヒーロン・角膜間の反射率 (0.024% と計算される) に近似出来る。またヒーロン・レンズ間の反射率は 0.029% である。一方ワイドコンバータを用い、生理的食塩水を仲介液とすると、生理的食塩水の屈折率は涙液と同じであるから、角膜・涙液+生理的食塩水間の反射率は 0.021%、レンズ・生理的食塩水間の反射率は 0.026% となり、ヒーロンはワイドコンバータを使用した場合と同等の光学的条件を備えていることが分かる。

今回の方法によれば、角膜上皮細胞を極めて高い確率で観察することが出来た。しかも表層細胞の詳細だけでなく、鏡面反射の少ない上皮深層の翼細胞並びに基底細胞を識別することが可能であった。これら深層細胞を生体観察した報告はまだ少なく、またそれらも病的状態における基底細胞の観察に限定されており⁴⁾⁷⁾⁻⁸⁾¹³⁾、翼細胞についての記載は見られない。特に正常眼については観察不可能とされていた基底細胞の映像を我々が内外に先駆けて捉えることが出来たのは画期的な成果と思われる。今回は正常者 10 名中 1 名のみ観察が可能であったが、一方翼細胞群は比較的容易に観察されており、これらの細胞群と類似した鏡面反射を持つと考えられる基底細胞をもっと高い頻度で観察することは決して不可能なことではない。また顆粒状角膜変性患者で認められた基底細胞の映像が正常者のそれと類似していた理由としては、実質内沈着物からの反帰光線による像ではなく前者も後者と同じ鏡面反射像を観察した可能性は否定出来ない。もう一つの可能性としては、沈着物の実質側からの侵入によって生じた Bowman 膜の変形¹⁷⁾ が角膜上皮浮腫における細胞間貯溜液と同じメカニズムで⁴⁾、基底細胞との間にスペキュラー上の境界面を作り基底細胞の観察が容

易になったとも考えられる。

ところで表層細胞に関しては、走査電顕の所見¹⁸⁾⁻²⁰⁾ との比較研究により、スペキュラーマイクروسコープで明るく見える light cell は microvilli が短いか少ない細胞で、一方暗く見える dark cell は microvilli が長いか多い細胞であるとの見解⁵⁾⁸⁾⁻⁹⁾ が支配的であるがこれは鏡面反射の原理からも理解できる。上皮細胞は成熟するにつれ重層扁平化され面積が大きくなり、やがては脱落する経過をたどるので、microvilli の数や細胞の大きさ、形態の相違から light cell は dark cell より老齢化した細胞であるとする意見¹⁸⁾ も認められる。しかし表層細胞は重層扁平上皮であり、細胞が互いに重なり合っているため、スペキュラーマイクروسコープの所見から、細胞の本当の大きさを判定することは必ずしも容易ではない。従って一層から成る内皮細胞の場合のように、隣接した細胞を連続して計測する方法を採用するには無理がある。最表層にあると判断された細胞を選択して計測した我々の方法の合理性については検討の余地があると思われるが、我々の結果でも light cell では年齢差は認められず⁶⁾、一方 dark cell では、同種の細胞が隣接している場合、各々の細胞境界を判別する事が難しく分布密度も light cell より少ないため、面積を正確に測定し平均値を算定して light cell と比較する事は困難であった。しかし上皮障害や創傷の治療過程において表層細胞面積および形態の変化が指摘されており³⁾⁻⁵⁾⁷⁾⁻¹²⁾、細胞面積や light cell/dark cell 比などは、角膜疾患の客観的データとして積極的に臨床応用すべきであろう。さて、今回 2 枚連続して撮影された同一部位の一枚目の写真において、剝離寸前の細胞が見られ、二枚目では、この細胞の消失した部分に一致して暗い第 2 層の細胞が露出しているのが観察された(図 6, 7)。1 個の小さな dark cell が light cell に取り囲まれて存在する所見は我々もしばしば眼にしており、今回の連続写真による結果から、dark cell の中の少なくともある部分は最表層細胞の剝離により露出した第 2 層の新しい細胞およびその延長線上にある細胞である可能性が大きい。しかしこの様にして最表層に達した dark cell が寿命を終えて脱落するまでの間に果たして light cell に変化するのか否かは不明である。

今回の研究で、我々は市販の装置に特別の改変を行わずに、比較的容易に角膜上皮細胞を表層細胞から基底細胞までに形態学的に識別することが可能であったことから、スペキュラーマイクروسコープの角膜上皮

に対する臨床応用が上皮深層細胞にまで拡大されることが期待される。

筑波大学眼科グループ長本村幸子教授の御校閲と御助言を感謝します。なお本論文の要旨は第13回角膜カンファレンス（札幌市）で講演した。

文 献

- 1) **Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM**: Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Arch Ophthalmol* 97: 1714-1719, 1979.
- 2) **Lohman LE, Rao GN, Aquavella JA**: Optics and clinical applications of wide-field specular microscopy. *Am J Ophthalmol*. 92: 43-48, 1981.
- 3) 葛西 浩, 江波戸文秀, 植田辰子他: 角膜上皮の specular microscopy. *眼紀* 31: 1704-1710, 1980.
- 4) 江波戸文秀, 葛西 浩, 崎元 卓: 角膜上皮 specular microscopy の臨床応用. *眼紀* 32: 1319-1324, 1981.
- 5) 濱野 孝, 堀田昌宏, 濱野 保: スペキュラーマイクロスコープ像と走査電子顕微鏡像との比較による角膜上皮の観察. *眼紀* 33: 1894-1900, 1982.
- 6) **Lohman LE, Rao GN, Aquavella JA**: Normal human corneal epithelium. In vivo microscopic observations. *Arch Ophthalmol* 100: 991-993, 1982.
- 7) **Lohman LE, Rao GN, Aquavella JA**: In vivo microscopic observations of human corneal epithelial abnormalities. *Am J Ophthalmol* 93: 210-217, 1982.
- 8) **Lohman LE, Rao GN, Tripathi RC, et al**: In vivo specular microscopy of edematous human corneal epithelium with light and scanning electron microscopic correlation. *Ophthalmology* 89: 621-1982.
- 9) **McFarland JL, Laing RA, Oak SS**: Specular microscopy of corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 101: 451-454, 1983.
- 10) **Wong S, Rodrigues MM, Blackman HJ, et al**: Color specular microscopy of disorders involving the corneal epithelium. *Ophthalmology* 91: 1176-1183, 1984.
- 11) **Lemp MA, Gold JB, Wong S, et al**: An in vivo study of corneal surface morphologic features in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Am J Ophthalmol* 98: 426-428, 1984.
- 12) **Lemp MA, Gold JB**: The effects of extended-wear hydrophilic contact lenses on the human corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 101: 274-277, 1986.
- 13) **Marechal-Courtois, C, Delcourt JC**: Wide-field specular microscopy of corneal epithelium. *CLAO Journal* 12: 165-172, 1986.
- 14) 中野秀樹, 山口 巖: Amiodarone Keratopathy のスペキュラーマイクロスコープによる観察. 第54回日本中部眼科学会講演抄録集, 京都, 198, 1988.
- 15) **Tsubota K**: A contact lens for specular microscopic observation. *Am J Ophthalmol* 106: 627-628, 1988.
- 16) **Philipson B**: A review of healon and its applications. *Proceeding of Advanced Viscosurgery Techniques Symposium, Los Angeles, 1986.*
- 17) **Spencer WH**: Cornea, in Spencer, WH (ed): *Ophthalmic Pathology*. WB Saunders Company, Philadelphia, 320-325, 1985.
- 18) **Hoffmann F**: The surface of epithelial cells of the cornea under the scanning electron microscope. *Ophthal Res* 3: 207-214, 1972.
- 19) **Pfister RR**: The normal surface of corneal epithelium. A scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol* 12: 654-668, 1973.
- 20) 堀 正樹: 角膜上皮の走査電子顕微鏡的研究. *眼紀* 31: 1355-1354, 1980.