

エキシマレーザー, Metal blade, Diamond blade による 角膜切開創 とくに創傷治癒の比較について

眞鍋 洋一¹⁾, 神鳥 英世¹⁾, 山口 達夫²⁾, 野寄喜美春¹⁾

¹⁾埼玉医科大学眼科学教室, ²⁾聖路加国際病院眼科

要 約

試作光学系を用いてスリット状にしたエキシマレーザーを家兎角膜に照射し, 切開創の形状及び創傷治癒について **metal blade**, **diamond blade** と形態学および組織学的に比較した。切開直後の切開創は, エキシマレーザーではレーザービームの最小切開幅が 100 μm であったため, 他の2者と比較してやや幅広であったが, その切開面は極めて鋭利であった。術1か月後の光学顕微鏡所見で, エキシマレーザーの創傷部において上皮下の実質前層に線維芽細胞の集合が最も少いことより, エキシマレーザーの創傷治癒は **metal blade**, **diamond blade** と比較して早いことが判明した。(日眼会誌 96:288-294, 1992)

キーワード: エキシマレーザー, 角膜切開, 角膜創傷治癒

Comparison of Wound Healing of Linear Incisions in the Rabbit Cornea Produced by the Newly Developed Excimer Laser, a Metal Blade, and a Diamond Blade

Yoichi Manabe¹⁾, Hideyo Kandori¹⁾, Tatsuo Yamaguchi²⁾ and Kimiharu Noyori¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Saitama Medical School

²⁾Eye Clinic, St. Lukes International Hospital

Abstract

We developed a new delivery system for corneal ablation with the 193 nm argon-fluoride excimer laser. The laser was used to make linear incisions in the rabbit cornea, and wound healing of the incisions was compared with the healing of incisions made with metal and diamond blades. The morphology of incisions made with excimer laser radiation (193 nm) was compared with the morphology of incisions produced by diamond and metal blades, and the corneal wound was examined by light and electron microscopy. The surface of the cornea at the site of the laser wound was smooth; the laser wound was wider than the blade wounds immediately after surgery. Two weeks after surgery, all wounds had healed equally. One month after surgery, there were fewer fibroblastic keratocytes in the laser wound, and the epithelial layer at the wound site was thinner than in the case of the blade wounds. These results suggest that wound healing of laser incisions is more rapid than healing of wounds created with metal or diamond blades. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:288-294, 1992)

Key words: Excimer laser, Corneal incision, Corneal wound healing

別刷請求先: 350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38 埼玉医科大学眼科学教室 眞鍋 洋一
(平成2年1月31日受付, 平成3年8月6日改訂受理)

Reprint requests to: Yoichi Manabe, M.D. Department of Ophthalmology, Saitama Medical School.
38 Morohongo, Moroyama-machi, Iruma-gun, Saitama 350-04, Japan

(Received January 31, 1990 and accepted in revised form August 6, 1991)

I 緒 言

エキシマレーザーはレーザー媒質を変えることにより、種々の波長のレーザー光を発振できる紫外線領域のレーザーである。特に Argon fluoride (193 nm) は角膜切開に応用され、実質に対する損傷も少いとされている¹⁾。我々は先にエキシマレーザーを家兎角膜に照射する基礎的な実験を行い、エキシマレーザーによって非常に鋭利な切開ができることを報告した²⁾。また照射光学系を試作し、家兎角膜に切開を行い光学系を用いない場合と比較して、切開創の幅が広がることも報告した³⁾。

エキシマレーザーと一般に用いられるメスとの切開の比較については Marshall ら⁴⁾が、エキシマレーザーは周辺組織に熱変性が少なく、鋭利な切開が可能で創傷治癒が早いと報告しているが、現在まで経時的な創傷治癒について組織学的に比較したものはない。我々はエキシマレーザー、metal blade、diamond blade を用いて角膜切開を行い、その創傷治癒について組織学的に検討した。

II 実験装置および方法

レーザー装置は Lambda Physik 社製 Model EMG-102 MSC を使用し、レーザー媒質として Argon fluoride を用いた。エキシマレーザーの照射条件は 100 Hz、5 秒間で、総出力は 160 J/cm²であった。metal blade は Beaver 社 76-A、diamond blade は Katena 社のものを使用し、刃先を 0.25 mm に調整して切開を行っ

た。エキシマレーザーでは眼球の動揺により切開の深さを一定にするのが、やや困難な場合があるが、眼球の固定法を工夫し、ほぼ 0.24 mm の深さの切開が得られた。metal blade、diamond blade についても切開の深さを同じにするのはかなり困難であるが、熟練した同一術者が施術し、角膜の厚みの約 2/3 層の切開を行うようにした。

実験には体重 2~3 kg の白色家兎 15 羽 30 眼を使用した。麻酔は塩酸ケタミン(ケタラル®)とキシラジン塩酸塩(セラクタール®)の混合液を筋注し、切開方法は右眼角膜の中央部を通るエキシマレーザーでの直線状照射を行った後、metal blade で角膜周辺部に放射状に 6 本の切開を行った。左眼も右眼と同様に角膜中央部を通るエキシマレーザーでの直線状照射後、diamond blade で放射状に 6 本の切開を行った(図 1)。実験直後(6 羽 12 眼)、2 週間後(5 羽 10 眼)、1 か月後(4 羽 8 眼)に眼球を摘出し、光学顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。摘出後、1%グルタルアルデハイドとホルマリンの混合液で固定し、光学顕微鏡用には通常の組織学的手法で脱水後パラフィンに包埋し、トルイジンブルー染色を行った。走査型電子顕微鏡用にはアルコールで脱水したのち、臨界点乾燥を行い銀蒸着を施し検鏡した。透過型電子顕微鏡用にはアルコールで脱水後、エポキシに包埋し超薄切片を作製し、ウランと鉛で染色し検鏡した。

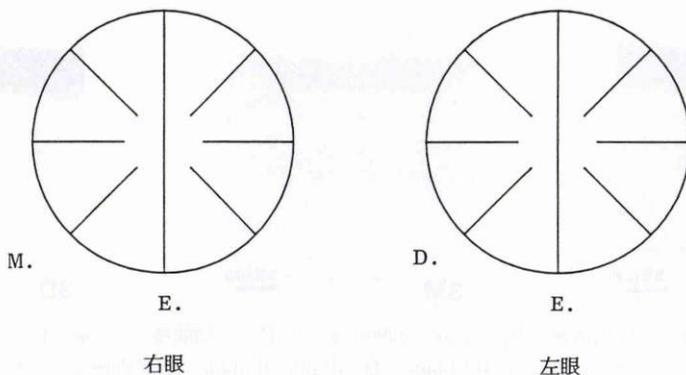


図 1 切開方法の模式図。

右眼：E=角膜中央部を通るエキシマレーザーでの垂直切開。M=metal blade で放射状に 6 本の切開を加えた。左眼：E=角膜中央部を通るエキシマレーザーでの垂直切開。D=diamond blade で放射状に 6 本の切開を加えた。

III 結 果

1. スリットランプ所見

照射直後の創は直線状でスムーズであり、角膜の厚みの2/3の深さで切開されていた。時間の経過とともに切開部は混濁し、その混濁部の幅が拡大した。創傷部の混濁の拡がりには3者とも差は認めなかった。

2. 光学顕微鏡所見

術直後はエキシマレーザーの切開創の先端部はU字形であったが、metal blade, diamond blade では切開創はV字形であった。また切開面ではエキシマレーザーとdiamond bladeではスムーズであったが、metal bladeでは不整であった(図2-1)。

術後2週では3者ともほぼ同様の所見であり、切開

の創傷部の上皮層は厚みを増し約一層となり、創傷の中央部では上皮細胞は扁平横長となり、走行に乱れがみられた。また上皮下の実質前層には線維芽細胞の集合がみられたが、その密度に3者間で差は認めなかった(図2-2)。

術後1か月では3者とも上皮層前面には凹凸があり、上皮下の実質前層には線維芽細胞の集合を認めたが、エキシマレーザーではmetal blade, diamond bladeと比較してその数が少ないことが観察された(図2-3)。

3. 走査型電子顕微鏡所見

術直後はエキシマレーザーの実質深層の切開面は幅広く(100 μ m)切開されており、metal blade, diamond bladeでは切開面はV字形であった。上皮実質の創傷

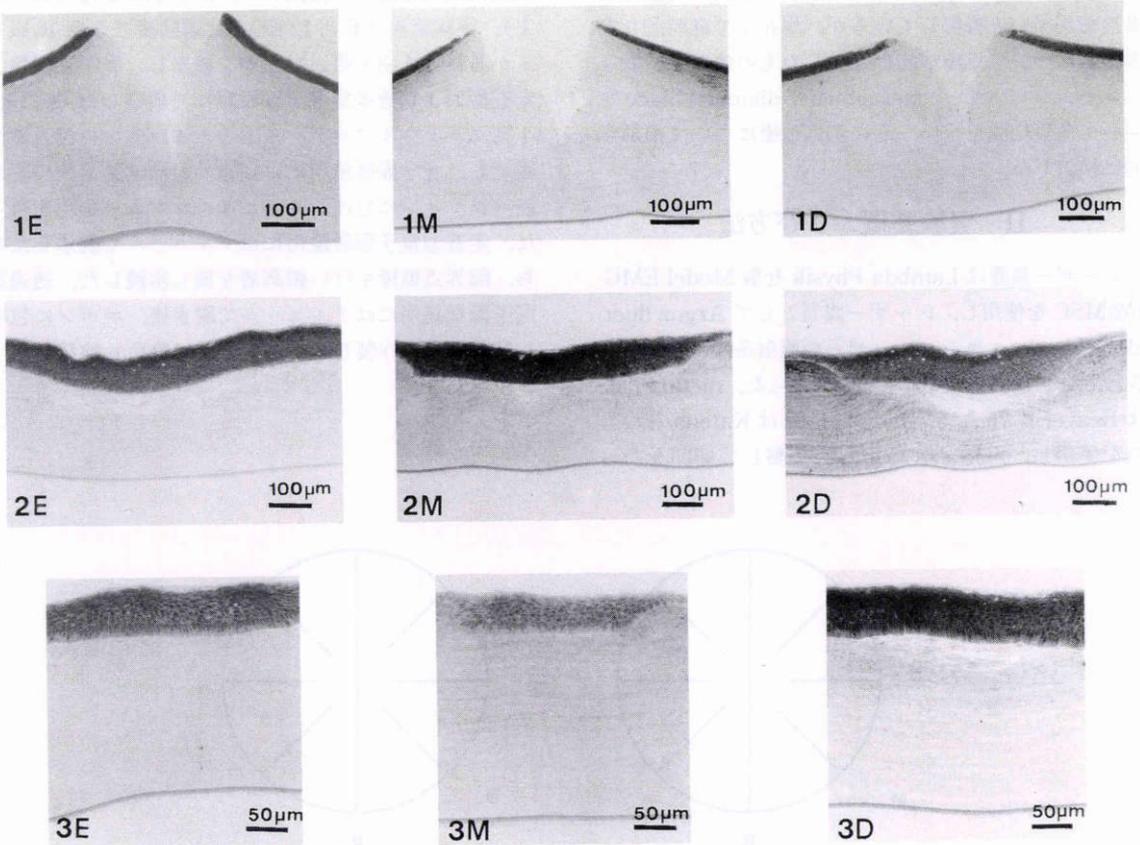


図2 光学顕微鏡写真。(上段)切開直後、(中段)2週間後、(下段)1か月後

(E) エキシマレーザー, (M) metal blade, (D) diamond blade. 切開直後ではエキシマレーザー(1E), diamond blade(1D)ではmetal blade(1M)に比較してスムーズに切開されている。術後2週では創周囲の上皮下の実質前層に線維芽細胞の集合を認める。3者に差は認めない。術後1か月では創周囲の線維芽細胞の集合は、エキシマレーザー(3E)で最も少ない。(トルイジンブルー染色, (1)×60, (2)×50, (3)×100)

面ではエキシマレーザーと diamond blade はスムーズであったが, metal blade では凹凸を認めた. またエキシマレーザーでは創傷部の両側約 $100\ \mu\text{m}$ の範囲に上皮細胞の変性が認められたが, metal blade, diamond blade では少数の変性した上皮細胞を認めた. エキシマレーザーではコラーゲン層間に空隙を認めた(図3-1).

術後2週では, 3者とも切開創は上皮細胞に覆われており, 凹凸があった(図3-2).

術後1か月では3者とも上皮細胞の不整はみられるが有意な差は認めなかった(図3-3).

4. 透過型電子顕微鏡所見

エキシマレーザーの術直後の創傷部実質の所見ではコラーゲン層間に段差を認めた. また電子密度の高い

物質を創の edge に $0.1\ \mu\text{m}$ の幅で認めた. diamond blade ではエキシマレーザーと同様に, keratocyte までスムーズに切開されていたが, 電子密度の高い物質は認められなかった. metal blade では切開面に凹凸が認められ不整であった(図4-1). 術後2週では, 実質細胞の数はエキシマレーザー, metal blade, diamond blade と差は認めなかった. 術後1か月では, 3者とも上皮下の実質に線維芽細胞様の細胞を認めたが, metal blade, diamond blade と比較し, エキシマレーザーの切開創ではこれらの細胞浸潤は少なかった(図4-2). また metal blade, diamond blade では, 膠原線維間に空隙が多数存在していたが, エキシマレーザーでは空隙の数が少なかった.

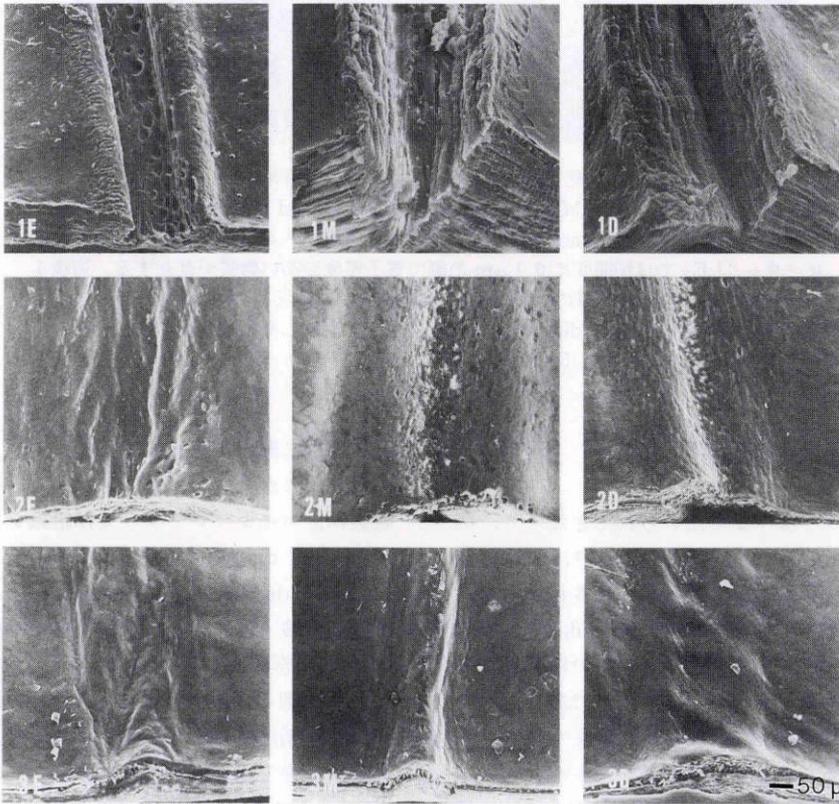


図3 角膜前面の走査型電子顕微鏡写真. (上段)切開直後, (中段)2週間後, (下段)1か月後

(E) エキシマレーザー, (M) metal blade, (D) diamond blade. 切開直後ではエキシマレーザー(1E), diamond blade(1D)で創部表面はスムーズであり, metal blade(1M)では凹凸を認める. 創部の表層の上皮細胞に凹凸を認めるが, 3者とも有意な差は認めない. ($\times 60$)

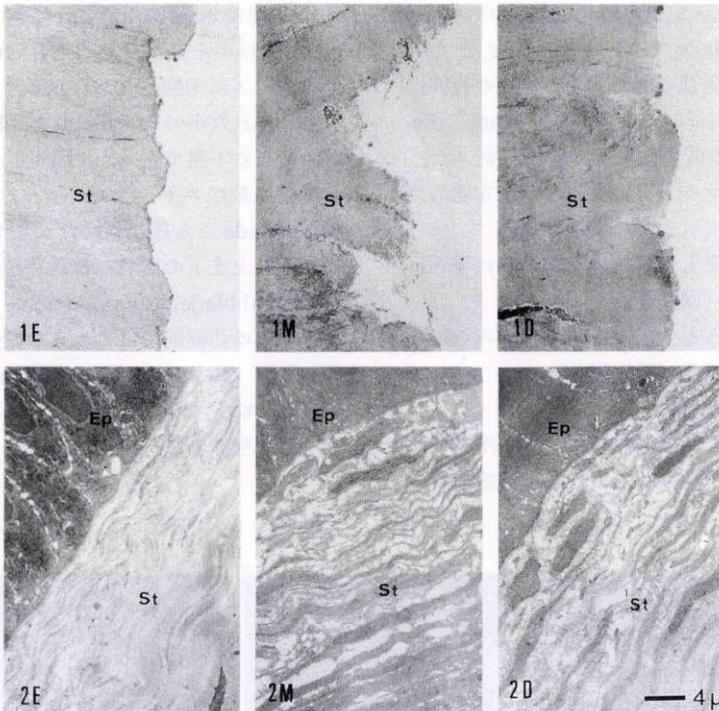


図4 創部の透過型電子顕微鏡写真。(上段)切開直後,(下段)1か月後
(E) エキシマレーザー,(M) metal blade,(D) diamond blade. 切開直後ではエキシマレーザー(1E),diamond blade(1D)の創傷部はスムーズであるが,エキシマレーザー(1E)では切開面に $0.1\mu\text{m}$ の幅で電子密度の高い物質が存在する.術後1か月では創傷部の実質前層に線維芽細胞の集合を認めるが,エキシマレーザー(2E)はmetal blade(2M)やdiamond blade(2D)に比較しその数が最も少ない.
Ep:上皮,St:実質($\times 1,500$)

IV 考 按

エキシマレーザーは今まで用いられてきたメス,例えばmetal,diamond blade等とは異なり,組織を破壊することによって切開できる点で注目されてきた.眼科領域への応用としては,1983年,Trokelら¹⁾が,Argon fluoride(193nm)を用いて家兎の角膜に切開を行い良好な結果を得たのが最初の報告である.その後の実験により,角膜では193nmの波長で最も鋭利な切開を得られることが判明した^{1)~7)}.エキシマレーザーの臨床への応用としては,切開(keratotomy),切除(keratotomy)などが研究されている.切開の応用の1つにanterior radial keratotomy(ARK)があり,従来はmetal blade,diamond bladeで行われてきたが,切開の深さが同一眼でも差があることが判明している.そのため切開の深さが出力と比例するエキシマ

レーザーに関心が高まった.

今回我々が行った結果では,術直後の各々の切開の特徴は,エキシマレーザーでは組織を掘っていくようにみられ,diamond bladeはスムーズに切断され,metal bladeは組織を引き裂くようであった.これは光学顕微鏡(図2),走査型電子顕微鏡(図3)所見においても認められた.diamond bladeとmetal bladeとの切開創の比較では,Galbavy⁸⁾がdiamond bladeでは切開創はスムーズであるが,metal bladeでは切開創は不整で上皮細胞に乱れがあり,切開創の幅ではdiamond bladeの方がmetal bladeより幅広であると報告しており,今回の我々の結果と同様であった.エキシマレーザーの切開でもdiamond bladeと同様に切開創はスムーズであったが,走査型電子顕微鏡による観察では創傷部の両側約 $100\mu\text{m}$ 離れた部位に上皮細胞に変性を認めた.この原因として,1)エキシマ

レーザーのビームが均一な平行光線として照射されていない, 2) 熱による作用, 3) 衝撃波, などが考えられる. 今後, 照射条件による内皮細胞への影響を観察する必要がある.

透過型電子顕微鏡所見においてもエキシマレーザーでは鋭利な切開創が得られているが, 創の表面より約 $0.1 \mu\text{m}$ の幅で電子密度の高い物質の沈着が帯状に見られた. これは従来のメス (diamond blade, metal blade) による切開では認めなかったものであり, Marshall⁶⁾は, この電子密度の高い物質を pseudomembrane と記載しているが, その原因については未だ解明されていない. Berns⁷⁾は, 切開時の角膜表面の温度を測定し, 50 Hz, $400 \text{ mJ}/\text{cm}^2/\text{pulse}$ で照射した場合, 切開面では最高 38°C であると報告している. しかしながら彼らの測定では, 広い範囲で温度を測定しており, 狭い範囲ではより高温である可能性がある. 故にこの pseudomembrane の原因は, 熱による変性かレーザー照射時に起こる衝撃波によるものかのいずれかと考えられる.

またエキシマレーザーの切開創はコラーゲン層間に小さな段差を認めた. これは Serdarevic⁵⁾の報告のように, レーザービームをコラーゲン層の走行と垂直に照射した場合と, 水平に照射した場合とでは切開の形状に違いがあり, 垂直に照射すると鋭利に切開できるが, 水平に照射するとコラーゲン線維束が散乱する事実により説明できる. これは照射時の衝撃波によって生じたものと考えられる.

切開創の幅については, エキシマレーザーでは他の2者と比較して幅広であった. これは本装置の光学系によって集光できるレーザービームの最小切開幅は $100 \mu\text{m}$ であり⁹⁾, 遮閉板などを用いずに直接用いたため他の2者より幅広になったものと考えられる.

角膜の創傷治癒については, Yamaguchi⁹⁾が家兎に ARK を施行し3年間経過を観察しているが, 実質の上皮側への修復はあまり行われず, 逆に創傷部は幅広となり菲薄化され, 術後3年経過しても実質前層にまだ fibroblastic な keratocyte が認められたことより, 創傷部では未だ修復過程にあったと報告している. 我々はエキシマレーザー, metal blade, diamond blade との比較を行ったが, 上皮層の厚みおよび切開創の幅が幅広くなった点では3者とも特に差を認めていない(図2). また2週間後の観察では, 上皮下の実質前層に fibroblast の集合を認めたが, 3者にその差は認めなかった. しかし1か月後の光学顕微鏡および

透過型電子顕微鏡所見において, 上皮下の実質前層の fibroblast の数がエキシマレーザーの創傷部で最も少ないことが確認された(図4). また1か月後の透過型電子顕微鏡所見において, エキシマレーザーでは膠原線維間の空隙の数が最も少なかった. これは角膜実質の創傷治癒においては keratocyte が fibroblast に変化してゆき, fibroblast の数が徐々に減少して治癒することを考えると, その数が術後1か月でエキシマレーザーでは少ないということは創傷治癒が早いということを示唆している. Tenner¹⁰⁾は, 人眼にエキシマレーザー (193 nm) で ARK を施行した例では, metal blade や diamond blade で施行したものより屈折矯正の変化が少ないことより, エキシマレーザーでの角膜切開は創傷治癒が早いと報告しているが, 我々の実験結果はこれを裏付けるものと思われる.

以上のように, エキシマレーザーは metal blade, diamond blade と比較して, 鋭利な切開が得られ, 創傷治癒が早いことが判明した. また創傷治癒の機序でも他の blade によるものと比較し, 特異な所見は観察されなかった.

エキシマレーザーの照射による紫外線の影響によって, DNA への突然変異の起こる可能性が指摘されているが, 現在までのところ実際に生じた報告はなされていない¹¹⁾. また我々の短期間の結果でも, エキシマレーザーによる障害は観察されなかった.

これらのエキシマレーザーの特性を生かして, 今後は, 角膜前部への治療的切除 (変性疾患・局所に限局した感染症), 屈折矯正手術などへの臨床応用が可能であると思われる.

本研究は, 文部省科学研究費補助金 (一般研究 A 62440070, 研究代表者, 野寄喜美春) の補助を受けた. 付記して感謝の意を表す.

文 献

- 1) Trokel SL, Srinivasan R, Braren B: Excimer laser surgery of the cornea. Am J Ophthalmol 96: 710-715, 1983.
- 2) 神鳥英世, 野寄喜美春: エキシマレーザーの角膜に対する応用, とくに角膜切開について. 日眼会誌 92: 2136-2142, 1988.
- 3) 眞鍋洋一, 神鳥英世, 山口達夫, 他: エキシマレーザーの角膜に対する応用, 照射光学系の試作. 臨眼 43: 1699-1702, 1989.
- 4) Marshall J, Trokel S, Rothery S, et al: A comparative study of corneal incisions induced by diamond and steel knives and two ultraviolet radiations from an excimer laser. Br J

- Ophthalmol 70 : 482—501, 1986.
- 5) **Serdarevic ON, Hanna K, Gribomont AC, et al** : Excimer laser trephination in penetrating keratoplasty. Morphologic features and wound healing. *Ophthalmology* 95 : 493—505, 1988.
 - 6) **Marshall J, Trokel SL, Rothery S, et al** : An ultrastructural study of corneal incisions induced by an excimer laser at 193nm. *Ophthalmology* 92 : 749—758, 1985.
 - 7) **Berns MW, Liaw LH, Oliva A, et al** : An acute light and electron microscopic study of ultraviolet 193-nm excimer laser corneal incisions. *Ophthalmology* 95 : 1422—1433, 1988.
 - 8) **Galbavy EJ** : Use of diamond knives in ocular surgery. *Ophthalmic Surg* 15 : 203—205, 1984.
 - 9) **Yamaguchi T, Tamaki K, Nakata S, et al** : Long-term histological evaluation of wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(Suppl) : 397, 1988.
 - 10) **Tenner A, Neuhann T, Schröder E, et al** : Excimer laser radial keratotomy in the living human eye : A preliminary report. *J Refractive Surg* 4 : 5—8, 1988.
 - 11) **Nuss RC, Puliafito CA, Dehm E** : Un-scheduled DNA synthesis following excimer laser ablation of the cornea in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 287—294, 1987.