

エキシマレーザー照射後の角膜知覚と神経再生の検討

石川 隆¹⁾, 金井 淳¹⁾, James V Aquavella²⁾, Manuel del Cerro²⁾¹⁾順天堂大学医学部眼科学教室²⁾The Cornea Research Laboratory and Department of Neurobiology and Anatomy,
University of Rochester Medical Center, Rochester, New York

要 約

エキシマレーザーによる角膜上皮切除と機械的剝離後の角膜知覚の回復の違いについて検討した。家兎角膜の右眼に機械的な角膜上皮剝離を施行, 左眼にはレーザーを照射した。レーザー照射条件は5 Hz, 160 mJ/cm², 切除の深さは47 μmとした。術後創傷治癒と角膜知覚について30週間観察し, 併せて上皮層内の角膜神経の分布についてゴールドクロライド染色法で観察した。機械的剝離では術後5日で50%, 28日目までにほぼ正常知覚となった。これに対しレーザー照射眼では術直後, 急速に回復し, 5日までにほぼ正常知覚となり, 42日目で最高

となり, 正常の165%に達し, 210日目にほぼ術前の値に復帰した。角膜上皮層内の角膜神経の相対的密度は術後35日で, レーザー照射眼で有意に高かった。レーザー照射による角膜知覚過敏が認められ, そのレベルと再生神経の数の相関が認められた。(日眼会誌 99:135-142, 1995)

キーワード: エキシマレーザー, 角膜知覚, 角膜神経, 角膜創傷治癒, ゴールドクロライド染色

Correlation between Corneal Sensitivity and Nerve Regeneration Following Excimer Laser Ablation

Takashi Ishikawa¹⁾, Atsushi Kanai¹⁾, James V Aquavella²⁾ and Manuel del Cerro²⁾¹⁾Juntendo Medical School of Medicine, Department of Ophthalmology²⁾The Cornea Research Laboratory and Department of Neurobiology and Anatomy,
University of Rochester Medical Center, Rochester, New York

Abstract

To compare the recovery of corneal sensitivity and corneal regeneration following excimer laser and manual epithelial debridement, the corneal epithelium of the right eye of New Zealand white rabbits (n=21) was manually debrided and the left eye was ablated with the excimer laser (47 μm depth, 5 Hz, and 160 mJ/cm²). We observed the wound healing rate and corneal sensitivity. The relative density of innervation on the intraepithelial layer was measured using gold chloride staining or right microscopic examination for 30 weeks. In the laser-ablated cornea sensitivity rapidly increased to a normal level by day 5, and then it continued to increase gradually and reached a maximum at day 42. Thereafter it remained elevated to 126 days and returned to normal at 210 days. There were

significant differences in the recovery of sensitivity following excimer ablation and manual epithelial removal. The relative density of innervation on the intraepithelial layer after excimer ablation was significantly higher than manual debridement at day 35. We observed a correlation between increased sensitivity levels and increased nerve density. This result suggests that for photorefractive keratectomy or phototherapeutic keratectomy, manual debridement of the corneal epithelium should be performed before stromal excimer ablation. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:135-142, 1995)

Key words: Excimer Laser, Corneal nerve, Corneal sensitivity, Wound healing, Gold chloride staining

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷1-3-1 順天堂大学医学部眼科学教室 石川 隆

(平成6年3月25日受付, 平成6年9月20日改訂受理)

Reprint Requests to: Takashi Ishikawa M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University, School of Medicine, 1-3-1 Hongo Bunkyo-ku Tokyo 113, Japan

(Received March 25, 1994 and accepted in revised form September 20, 1994)

I 緒 言

エキシマレーザーは、1986年に初めて Trokel ら¹⁾によって眼科領域に応用されて以来、多くの基礎研究^{2)~6)}に引き続き、臨床的なデータも数多く出され^{7)~9)}、FDAにおける臨床治験もその最終結果が出されようとしている。日本でも今年から数種類のエキシマレーザーが治験段階を迎えている。現在、その応用範囲は近視、乱視、さらには遠視にまで広がってきている。また、治療的レーザー角膜手術が行われ、本来であれば角膜移植の対象になっていた疾患に対しても応用でき、角膜移植待ちの患者数をかなり減少させることが出来るため、その実用化が期待されている。しかし、角膜屈折矯正手術(PRK)ではいくつかの問題があり、さらに、長期的な観察を要求されている。その一つには角膜上皮混濁があり、PRK術後の創傷治癒におけるメカニズムの解明が期待されている。その中では角膜知覚神経の再生も重要な役割を担っている。我々は家兎眼における予備実験で、レーザー照射後、角膜知覚過敏が比較的長期にわたり持続することを観察した。その後、PRK術後の角膜知覚に関する論文^{10)~12)}が認められ、それらでは術後角膜知覚低下となることが報告された。我々は、その矛盾を検討する目的で、角膜神経の創傷治癒について角膜知覚の面から、また角膜神経をゴールドクロライド染色法による組織学的な面から検討を加えたのでここに報告する。

II 実験方法

実験動物はニュージーランド産白色家兎(2.7~3.5 kg) 21匹を使用した。ザイラジンと塩酸ケタミン(ケタラール®)の筋注で十分な麻酔を行い、表面麻酔剤を点眼、頭部を手術顕微鏡下に固定した。右眼には直径5 mmのトレパンで軽くマーキングをした後、角膜上皮の機械的剝離をレーザーブレードのスムーズで鈍的な面を使用して行った(manual debridement)。左眼はVISX製エキシマレーザー(20/20)を照射した(excimer ablation)。レーザー照射は開瞼器を掛け、角膜のセンターに軽くマーキングした後、エイミングビームでフォーカスを角膜上に合わせ、眼球を鑷子で固定し、フットスイッチによりエキシマレーザーを照射した。このとき、窒素ガスによるブローイングと吸引を行った。照射条件は直径5.0 mm、パルスは5 Hz、1ショットあたりのエネルギーは160 mJ/cm²であった。レーザー照射時間は10秒前後であった。術後は抗生物質軟膏の点入、術翌日から抗生物質点眼で経過観察を行った。

検査項目は、レーザーにおける角膜上皮切除厚の条件設定、角膜上皮創傷治癒率、角膜知覚、および再生角膜上皮神経のゴールドクロライド染色である。

レーザーによる角膜上皮切除厚測定のための角膜試料は、レーザー角膜上皮切除と機械的剝離直後、2%グル

タールアルデヒド、2%パラホルムアルデヒド(0.1 M カコジレート緩衝液)で固定、1%オスミウム酸で固定し、1%ウラニール酸染色後、脱水、包埋した。ブロックを0.5 μm切片で作成、1%トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡(光顕)で観察した。

角膜上皮創傷治癒率は、術直後、10、20、28、36、46時間後、0.25%フルオレセイン染色した後、TMAX 400フィルムに蛍光撮影を行った。写真上の染色部分をトレーシングペーパーにトレースし、それをツァイス社製MOP-3イメージアナライザーで測定した。

角膜知覚検索は、11匹のうち6匹の観察期間は、術前、第1、2、3、7、10、14、21、28、残りの5匹が術前、第1、2、3、7、10、14、21、28、35、42、56、126、210病日であった。測定はCochet-Bonnet角膜知覚計を使用。測定前に睫毛切除、角膜に接触するナイロン糸の長さは6~0.5 cmまでを0.5 cm間隔で行い、その各々につき10回施行した。瞬目する回数を記録し、そのグラフから、瞬目回数の5回の時のナイロン糸の長さを角膜知覚とした。

角膜上皮神経再生の観察はゴールドクロライド染色法を用いた。図1に角膜上皮神経のカウントの方法を示した。5 mmの角膜切除範囲内で図のように5つの部位で行った。接眼レンズ内は10本の平行線をもつ正方形が挿入されており、光顕400倍の拡大でこの10本線と交差する神経数をすべてカウントし、5つの部位の神経数を合計し、平均を出し、この値を相対的角膜神経数とした。観察した家兎は、術前6匹、3日後5匹、35日後5匹、210日後3匹であった。

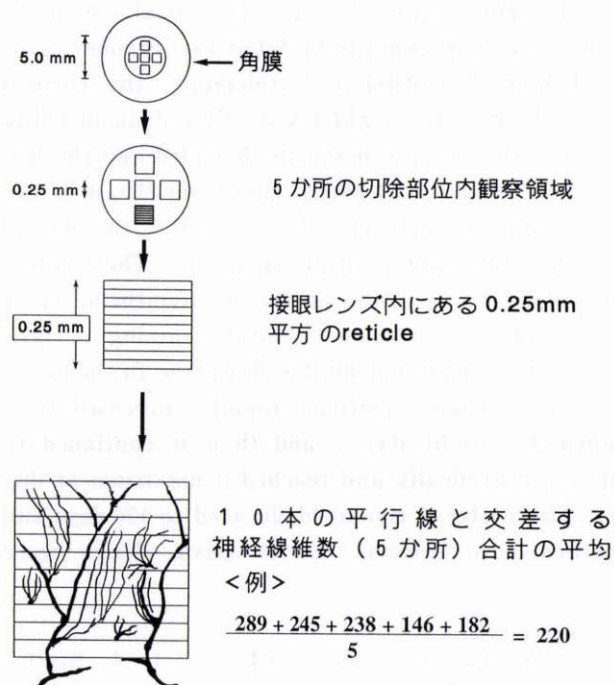


図1 ゴールドクロライド染色による角膜神経測定法。角膜切除部内の5つの測定点で角膜上皮内神経を400倍で計測し、その平均を求める。

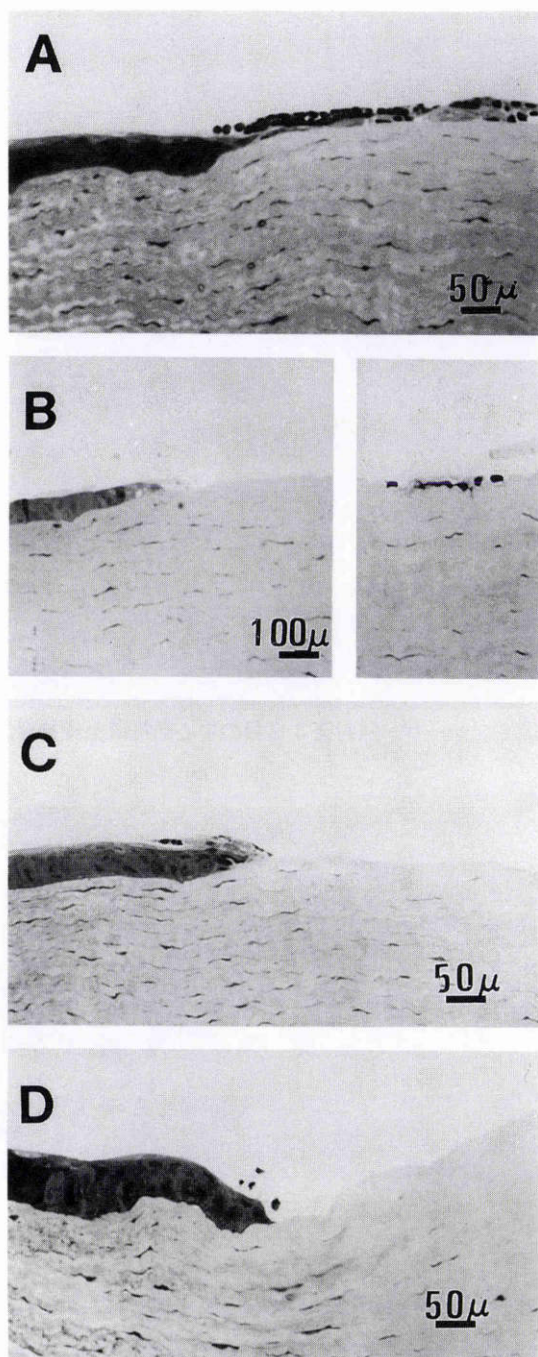


図2 エキシマレーザーによる角膜切除後の光学顕微鏡（光顕）写真。

A: 40 μm のレーザー切除では角膜上皮が残存している。B: 45 μm 切除では角膜上皮の一部で残存組織が認められる。C: 50 μm 切除では完全に切除されている。D: 機械的角膜上皮剝離では完全に上皮は切除されている。

ゴールドクロライド染色法は、術直後に強角膜片で切除し、10% ホルマリン液 (pH 5.5) 4 分間固定、新鮮なレモン汁中に 5 分間、その後、1% ゴールドクロライド液で 10 分間染色し、酢酸 (pH 2.8) に 14 時間浸漬、そして、一連の脱水 (70, 90, 95, 100% エチルアルコール) を行った。エチルアルコール中で角膜上皮を含む前 3 分の 1 層のみを鑷子で注意深く切離し、脱水後、スライド

上にマウントし、光顕で観察した。

III 結 果

1. レーザー照射による上皮切除のための設定条件

図 2 は上から 40, 45, 50 μm のレーザー切除、そして機械的上皮剝離の 4 つの組織像を示した。40 μm の切除では角膜基底細胞が残存しているのが観察され、45 μm の切除ではほとんどの基底細胞は除去されているが、一部で角膜基底細胞の残存組織が認められた。50 μm では切除は角膜実質にまで達してしまうため、角膜上皮の厚さ設定は 47 μm とした。

2. 角膜創傷治癒率

角膜創傷治癒の経時的变化をフルオレセイン染色写真で観察すると、ややエキシマレーザーで治癒が遅い傾向が認められた。この創傷部位の大きさを縦軸に、横軸に時間をとってプロットしてみると (図 3)、レーザー照射はやはり治癒が遅い傾向を認めた。このグラフは 2 相性で、0~10 時間の創傷治癒のゆっくりとした相と、それに引き続く創傷治癒の比較的早くほぼ直線的な相があり、後者の異なった測定時期である 5 ポイントをリニアリグ

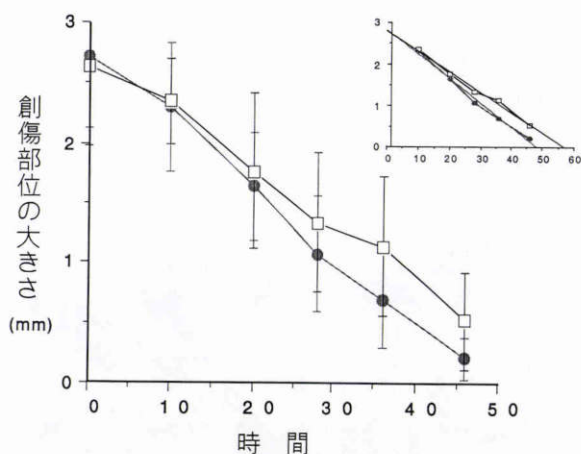


図3 レーザー切除と機械的剝離の角膜上皮創傷治癒。

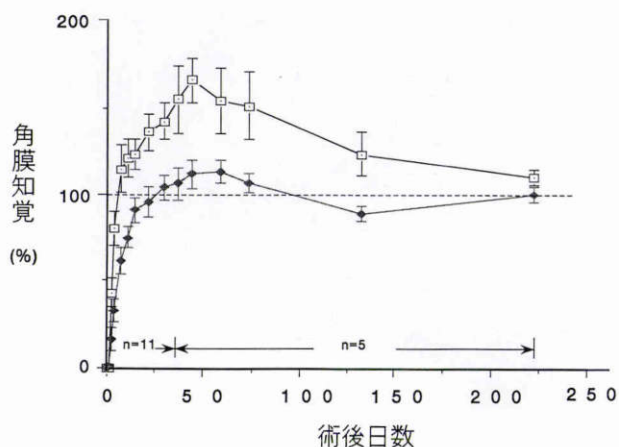


図4 レーザー切除と機械的剝離の角膜知覚の経時的变化。

レッシュンラインで示してみると上皮の再生速度は、エキシマレーザーで $49.0 \mu\text{m/hr}$ 、機械的剝離では $57.1 \mu\text{m/hr}$ であったが、両者には統計学的に有意な差は認められなかった。また完全な創傷治癒は、レーザー照射では 58 時間、機械的切除では 48 時間で、レーザー照射での創傷治癒が若干遅かったが、統計的にはやはり有意な差を認めなかった。

3. 角膜知覚

角膜知覚の変化を経時的に観察すると(図4), 角膜知覚は機械的剝離において, 5日後に正常の50%に低下し, 28日後には正常近く復帰するが, レーザー照射では5日後には既に正常に復帰し, 10日後には正常の120%, 42日には165%と知覚過敏となり, 以後, 徐々に正常値に近づき, 7か月後には正常値となった。また, エキシマレーザー照射では, 機械的剝離に比較し, 術後2日目に2.81倍, 7日目に1.61倍, 21日後と70日後に1.42倍となり, 4か月後まで統計学的に有意に知覚過敏の状態を示した (two-factor repeated anova, time $p < 0.0144$, methods $p < 0.0001$, interaction $p < 0.0272$)。ゴールドクロライド染色法による顕微鏡写真をみると, レーザー照射後3日目(図5, 6)の境界部では既に周辺部から中心部に向かって再生神経が延びていた。長いものでは1mmを超えるものもあった。しかし, レーザー照射後3日目の中心部では, いくつかの変性した神経線維以外には, 再生角膜上皮神経は認められなかった。同様に機械的剝離後3日目(図7, 8)の境界部では,

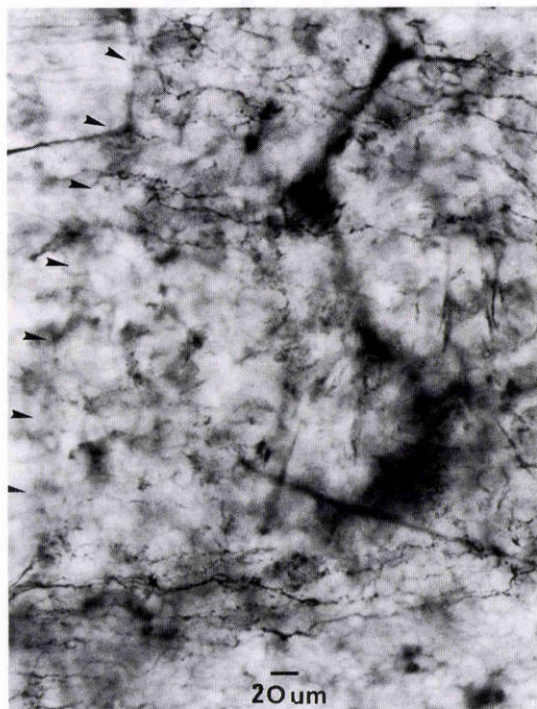


図5 レーザー照射後3日目の境界部角膜上皮神経。(図5~14 両者によるゴールドクロライド染色写真。)

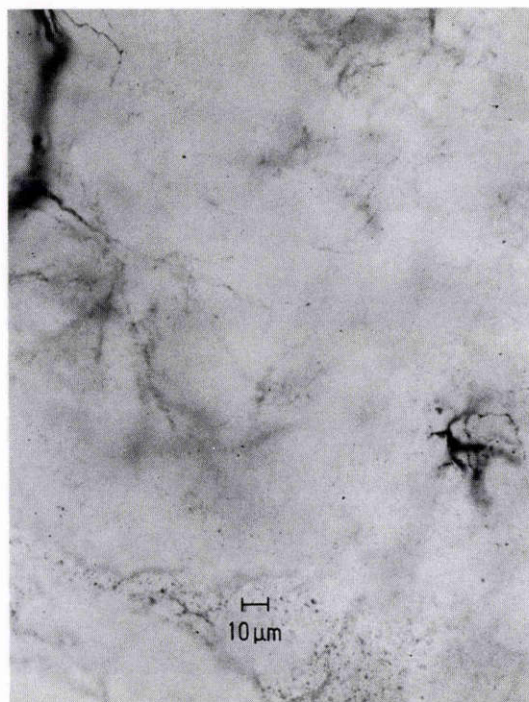


図6 レーザー照射後3日目の中心部角膜上皮神経。

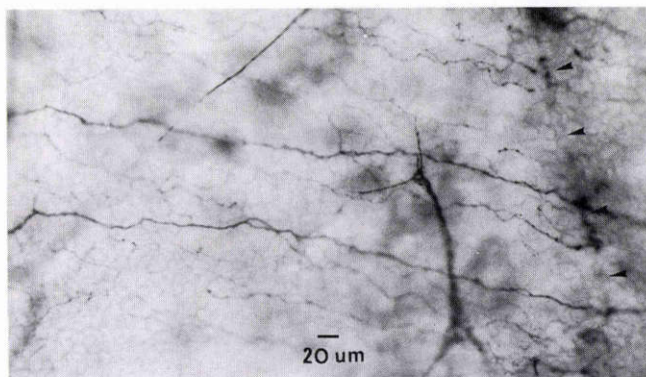


図7 機械的剝離後3日目の境界部角膜上皮神経。

再生神経は長いものでは1mm以上延びているものも認められたが, やはり中心部では認められなかった。

レーザー照射後35日目(図9, 10)の中心部の角膜上皮神経では, 切除部下方の上皮下神経叢から紐状神経(leash nerve)の再生がみられ, フォーカスをずらすことによりその神経終末をもった軸索のネットワークが至る所に認められた。また, 境界部周辺からの再生神経は術後3日目に比べ, 数も多く, 長さも長くなっていた。同様に機械的剝離35日目(図11, 12)の中心部の角膜上皮神経は, やはりレーザー照射と似たようなパターンを示したが, 神経終末の数はレーザー照射に比べ少なかった。

術後7か月(図13, 14)の中心部上皮層内では, 両者ともに上皮下神経叢からの神経終末をもった軸索のネットワークや leash nerve が認められ, 周辺部からの leash nerve もほぼ正常に近い値をとっていた。

このように観察された角膜上皮神経の経時的变化を両

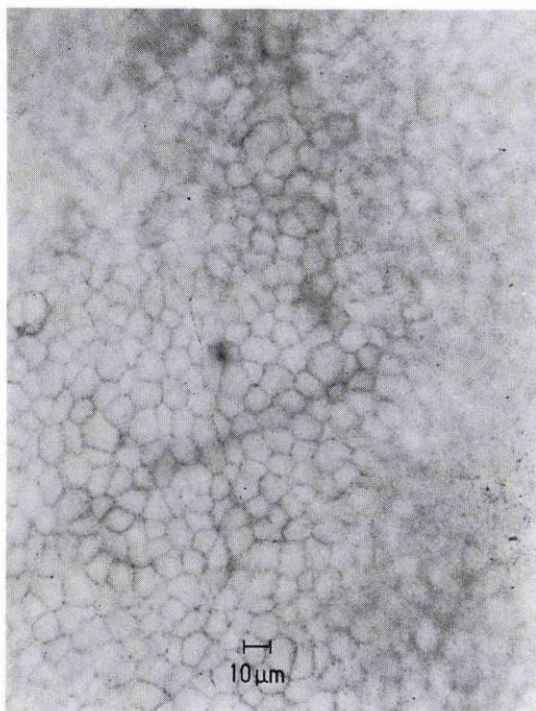


図8 機械的剝離後3日目の中心部角膜上皮神経.

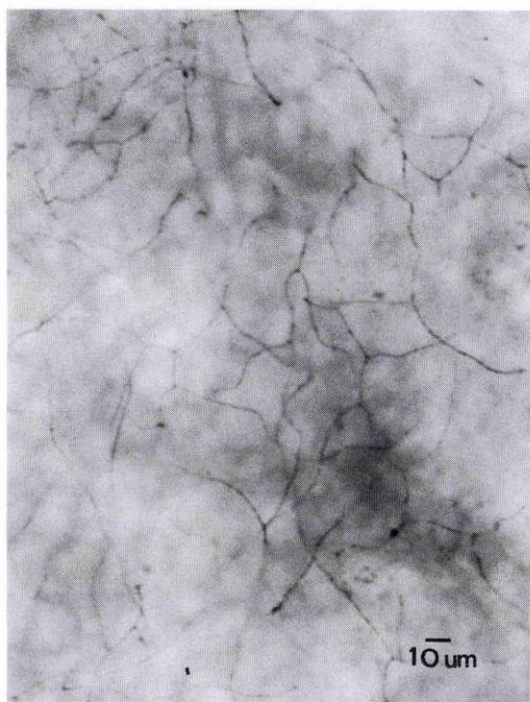


図10 レーザー照射後35日目の中心部神経終末.

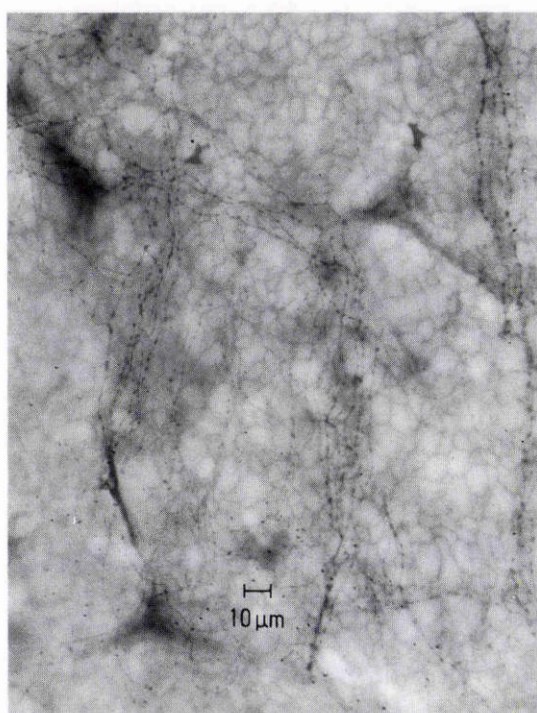


図9 黒矢印は正常部とレーザー照射部の境界線を示す。レーザー照射後35日目の中心部角膜上皮神経.

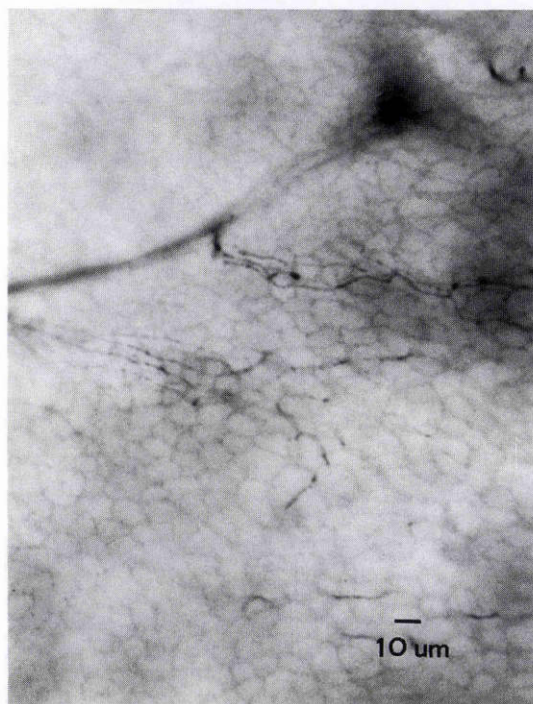


図11 機械的剝離後35日目の中心部角膜上皮神経.

者で比較すると(図15), 相対的角膜上皮神経数は, エキシマレーザー照射群では術後3日目に正常の45.8%, 35日後には116%となり, 210日後には87.1%であった。一方, 機械的角膜上皮剝離では, 3日後に39.2%, その後, 徐々に回復し, 35日後に78%, 210日後には正常の85.6%となった。術後3日目には両者に差はないが, 35

日目にはレーザー照射は機械的剝離と比較し, 統計学的に有意に増加していた(t 検定, $p < 0.01$)。両者とも7か月後には正常値近くに回復するも, まだ完全には戻っていなかった。

IV 考 按

レーザー照射後の角膜上皮創傷治癒率に関してはいく

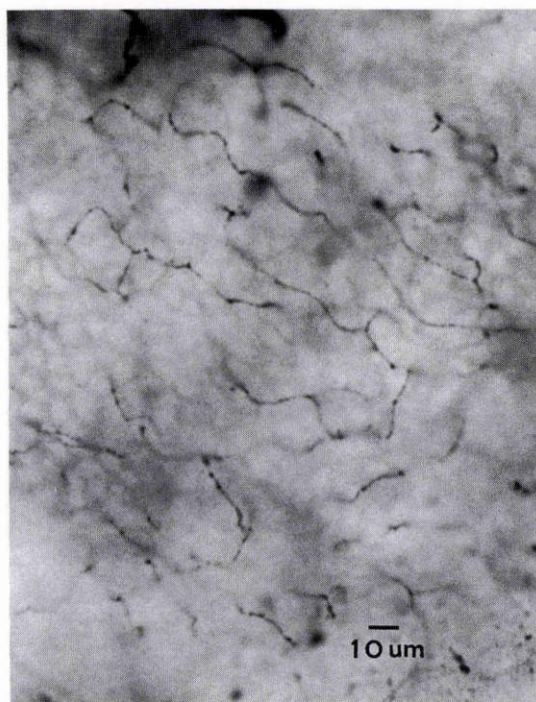


図 12 機械的剝離後 35 日目の中心部神経終末.

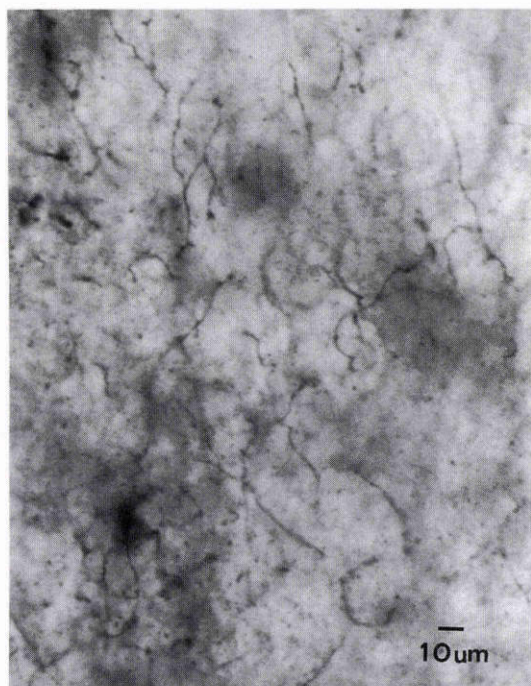


図 14 機械的剝離後 7 か月目の中心部角膜上皮神経と神経終末.

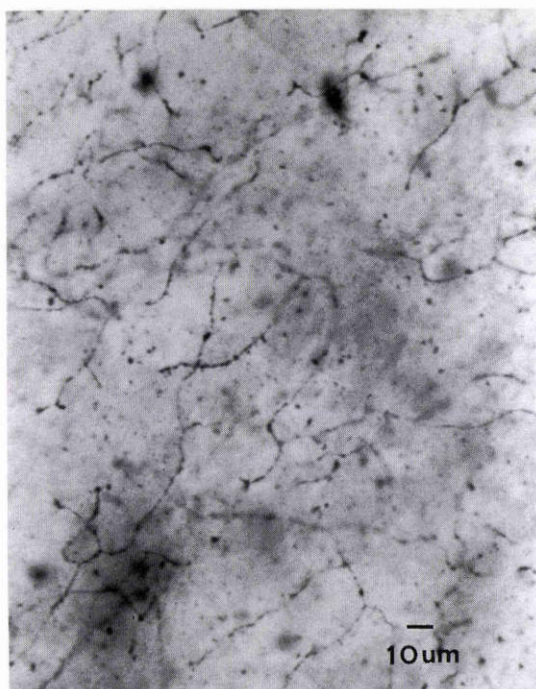


図 13 レーザー照射後 7 か月の中心部角膜上皮神経と神経終末.

つかの文献がみられる⁶⁾¹³⁾¹⁴⁾が、これらの結果は、両者間に有意差を認めていない。しかし、いずれも角膜上皮の切除だけでなく、実質切除も含まれているので我々の方法とは少し違っている。角膜上皮創傷治癒は、レーザー照射群で遅い傾向を認めているが、この理由については不明確である。

角膜知覚はレーザー照射例において、機械的剝離と比較し、第 2 病日から 4 か月後まで、統計学的に有意に知

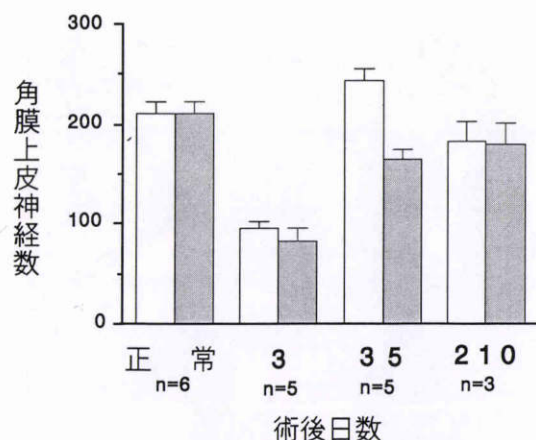


図 15 角膜上皮神経の術後経時的变化.

覚過敏を認めた。Millodot¹⁵⁾は長波長の紫外線により照射後 4 時間で角膜知覚過敏の状態になることを示した。しかしこの報告は、角膜知覚で重要な役割を果たしていると考えられている角膜実質内の上皮下神経叢が切除されており、我々の実験方法とは異なっている。したがって、短波長であるエキシマレーザー照射による角膜上皮のみの切除後の知覚過敏に関する報告はこれが初めてである。

一般に角膜神経密度は角膜中心に一番多いとされており、角膜神経数と角膜知覚は比例する。Margreet ら¹⁶⁾は兎のヘプタノールによる角膜上皮剝離後の角膜知覚は、速やかに 2.5 週～4 週で術前のレベルの 60% に回復することを報告している。また、Chan ら¹⁷⁾は、同様の実験で、角膜神経密度は 4 週以内にコントロールの 60% に戻

るとしている。これらのことから術後の角膜知覚は、角膜神経数に大いに関係することが考えられる。このことは、今回の結果である角膜知覚と角膜上皮神経数の正の相関を裏付けている。しかしその反面、エキシマレーザー照射後2日目、既に角膜知覚は正常の80%近くまで回復したにも関わらず、角膜上皮神経は46%しか認められなかったことから、角膜知覚は単に神経の数だけ依存するのではなく、それ以外のファクターの関与も十分に考えられることを示唆している。レーザーによる角膜切除と機械的角膜切除によってどうして神経再生状態が異なるのかについては、これらのファクターについての解明を待たねばならない。考えられるファクターについては文献的考察からの推測となるが、ここに述べておきたい。

一つは、レーザーによる熱変性である。193 nm以上の長波長の紫外線では熱作用の影響が報告されている^{18)~23)}が、エキシマレーザーは熱による近接の組織変性を起こさないとされている¹⁾²⁾⁹⁾²⁴⁾。しかし、例えこのレーザーの過程が光学的切除であっても、切除された組織がガス状態に変換されるということは二次的にしろ、近接組織に影響を及ぼすことは十分に考えられる。Eifermanらは1992年に近視手術の照射条件で、マイクロプローブを角膜中央に挿入し、照射部分とその周辺の温度上昇を報告しているが、これによると温度上昇はビームの直径と照射数に関係し、最高16度上昇していると発表している。我が国でも最近このような報告²⁵⁾もみられる。

レーザー術後、角膜知覚測定時に、いわゆる瞬間的な瞬目はなく、兎は数秒間、眼瞼を痙攣させるような態度を示すが、機械的角膜切除では一般的な瞬目だけが観察される。皮膚熱傷において我々が経験する“delayed pain”は原因は不明であるが、レーザー照射後の疼痛はむしろこれに近い感覚と思われる。我々の実験では角膜上皮のみの剝離であるので、熱作用はそれほど角膜組織に影響を及ぼさないと考えられるが、もし、角膜実質を含むような深い切除であればその作用も当然、増大するものと考えられる。

光化学的な影響として、Chanら¹⁷⁾は角膜上皮から分泌され、神経線維の成長をプロモートするといわれるENF (epithelial neuronotropic factor)が、培養上皮で、レーザー後2週間で2.4倍に上昇することを示している。神経伝達物質であるCGRP (calcitonin gene-related peptide)や、サブスタンス-P、ケミカルメディエーターなどが術後に増加していることも考えられる。Phillipsら²⁶⁾はアラキドン酸代謝産物の1つであるPGE₂がレーザー照射後術直後から上昇し、これはジクロフェナック点眼剤で抑制されたと報告している。さらに、この点眼によりかなり術後の疼痛が緩和されることを考慮すると、これらの化学物質が角膜知覚に影響を与えていることも十分に考えられる。また、Chanら²⁷⁾はシュワン細胞

が神経損傷の回復に一役買っていることを示し、神経再生はシュワン細胞と神経芽細胞によって作られた細胞外基質が重要な役割を果たしているとしている。今後はこのような免疫、生化学的要素について十分検討する必要があると思われる。

今までに述べてきたように、エキシマレーザー照射後の知覚過敏ということを考慮すると、PRKにおいてはレーザー照射前に機械的に角膜上皮を切除することが望ましく、また、今後、疼痛に対する処置を検討することがポイントの一つであり、そのためには、原因の解明が必要であることが痛感される。

文 献

- 1) Trokel SL, Srinivasan R, Braren B: Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 96: 710-715, 1983.
- 2) Marshall J, Trokel S, Rothery S, Schubert H: An ultrastructural study of corneal incisions induced by an excimer laser at 193 nm. *Ophthalmology* 92: 749-758, 1985.
- 3) Hanna KD, Pouliquen Y, Waring III GO, Savol-delli M, Cotter J, Morton K, et al: Corneal stromal wound healing in rabbits after 193 nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 107: 895-901, 1989.
- 4) Lang GK, Schroeder E, Koch JW, Yanoff M, Naumann GOH: Excimer laser keratotomy. Part 1: Basic concepts. *Ophthalmic Surg* 20 (20): 262-267, 1989.
- 5) Goodmann GL, Trokel SL, Stark WJ, Munner-lyn CR, Green WR: Corneal healing following laser refractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 107: 1799-1803, 1989.
- 6) Gaster RN, Binder PS, Coalwell K, Berns M, McCord RC, Burstein NL: Corneal surface ablation by 193 nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 90-98, 1989.
- 7) Sher NA, Bowers RA, Zabel RW, Frantz JM, Eiferman RA, Brown DC, et al: Clinical use of the 193 nm excimer laser in the treatment of corneal scars. *Arch Ophthalmol* 109: 491-498, 1991.
- 8) Litwin KL, Moreira H, Ohadi C, McDonell PJ: Changes in corneal curvature at different excimer laser ablative depths. *Am J Ophthalmol* 111: 382-384, 1991.
- 9) Aron-Rosa DS, BoOemer CF, Gross M, Timsit JC, Delacour M, Bath PE: Corneal wound healing after excimer laser keratotomy in a human eye. *Am J Ophthalmol* 103: 454-464, 1987.
- 10) Daya SM, Sher NA, Barak MH, Lane SS, Doughman DJ, Carpel E, et al: Photorefractive keratectomy using the 193-nm excimer laser for reduction of myopia in sighted eyes. *ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 761, 1992.

- 11) **Garbus J, Campos M, Hertzog L, McDonnell PJ**: Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy. ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 760, 1992.
- 12) **Campos M, Hertzog L, Garbus JJ, McDonnell PJ**: Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy. Am J Ophthalmol 114: 51—54, 1992.
- 13) **Crosson CE, Klyce SD, Beuermann R**: Epithelial wound closure in the rabbit cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 464—473, 1986.
- 14) **Kwok LS, Madigan M**: A new analysis of wound closure kinematics in the cat and rabbit corneal epithelium. Clinical & Experimental Optometry 69: 4—12, 1986.
- 15) **Millodot M**: A review of research on the sensitivity of the cornea. Ophthalmic Physiol Opt 4: 305—318, 1984.
- 16) **Margreet de Leeuw A, Chan KY**: Corneal nerve regeneration. Correlation between morphology and restoration of sensitivity. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1980—1990, 1989.
- 17) **Chan KY, Jones RR, Bark DH, Swift J, Parker JA, Haschke RH**: Release of neuronotrophic factor from rabbit corneal epithelium wound healing and nerve regeneration. Exp Eye Res 45: 633—646, 1987.
- 18) **Nafe J, Wagoner K**: Insensitivity of cornea to heat and pain derived from high temperature. Am Psychol 49: 631—635, 1937.
- 19) **Lele PP, Weddell G**: The relationship between neurohistology and corneal sensibility. Brain 79: 119—154, 1956.
- 20) **Beuerman RW, Tanelian DL**: Corneal pain evoked by thermal stimulation. Pain 7: 1—14, 1978.
- 21) **Bende T, Seiler T, Wollensak J**: Side effects in excimer corneal surgery. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 226: 277—280, 1988.
- 22) **Lewis M, Dubin M, Aandahl V**: The physical properties of bovine corneal collagen. Exp Eye Res 6: 57—69, 1967.
- 23) **Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I**: Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. J Physiol 437: 709—725, 1990.
- 24) **Marshall J, Trokel S, Rothery S, Krueger RR**: Photoablative reprofiling of the cornea using an excimer laser photorefractive keratectomy. Lasers Ophthalmol 1: 21—48, 1986.
- 25) **伊藤清治, 新妻卓矢, 伊藤退助, 石井康雄, 林 正泰, 普天間稔**: エキシマレーザーの臨床応用の問題点. 日本の眼科 64: 3—8, 1993.
- 26) **Phillips AF, Szerenyi K, Mampas M, Krueger RR, McDonnell PJ**: Arachidonic acid metabolites after excimer laser corneal surgery. Arch Ophthalmol 111: 1273—1278, 1993.
- 27) **Chan KY, Järveläinen M, Chang JH, Edenfield MH**: A cryodamage model for studying corneal nerve regeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 2008—2021, 1990.