

## ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

## 水疱性角膜症の癒痕形成の検出と臨床的意義

森重直行

山口大学大学院医学系研究科眼科学分野(眼科学) 宇部市南小串1丁目1-1(〒755-8505)

Key words: 水疱性角膜症, 癒痕形成, 実質浮腫

## 和文抄録

水疱性角膜症は、角膜内皮の不可逆性機能不全により角膜実質浮腫を来す疾患であり、現在では角膜移植でのみ視力回復が可能な疾患である。角膜移植手術の術式の変遷により、水疱性角膜症患者角膜実質の透明性確保の重要性が注目されている。我々は、第2次高調波発生顕微鏡を検出機器として用い、水疱性角膜症における角膜実質のコラーゲン線維束構造変化と角膜実質細胞の性状変化を評価し、癒痕性変化の検出を行った。それらの病理組織的变化と臨床経過との関連を比較検討した。我々の検討から、水疱性角膜症の罹病期間が角膜実質の癒痕性変化に影響することが明らかとなり、さらには水疱性角膜症の罹病期間が角膜内皮移植後の視力予後に影響することを見いだした。これらのことから、水疱性角膜症は病理組織学的にも臨床的にも罹病期間依存性進行性疾患であるということを提唱するに至った。

## 1. 緒言

角膜は、上皮層、Bowman膜、実質層、Descemet膜、内皮層の単純な5層構造からなる透明組織である。眼球の再表面に位置する組織であるため、強固な組織構造を維持しながら、その透明性も維持しなければならない。角膜の強靱性と透明性という非常に両立しがたい特性は、角膜実質の立体構造によって成立している。角膜実質は、I型コラ

ーゲンを中心とするコラーゲンがその体積の大部分を占めている。角膜実質中に存在するコラーゲン線維は、同じ方向性を有するコラーゲン線維が束構造を形成し<sup>1, 2)</sup>、かつ3次元的に整然と配列し<sup>1)</sup>、透明性を維持しながら角膜の剛性維持に大きく関与していると考えられている<sup>3)</sup>。

水疱性角膜症は、角膜内皮細胞の不可逆的な機能低下により発症する角膜浮腫性疾患である。角膜内皮細胞の機能は角膜実質内の水分を前房内へくみ出すポンプ機能であるが、この角膜内皮細胞機能が障害されると角膜実質の浮腫が生じ角膜が混濁する。ヒト生体内では角膜内皮細胞は増殖しないため、いったん角膜内皮が傷害されるとその機能不全は不可逆性となり、その機能回復のためには角膜移植が現在行いうる唯一の治療法である。水疱性角膜症に対する角膜移植は、角膜を上皮から内皮までの全層すべて「入れ替える」全層角膜移植が一般的に行われてきたが、最近では角膜内皮、Descemet膜、後部角膜実質のみを患者角膜内皮側に吸着させ内皮機能を「補充する」角膜内皮移植に置き換わる傾向にある<sup>4)</sup>。角膜内皮移植の成績は全層角膜移植と比較して良好<sup>5)</sup>とされているが、視力回復が不十分な症例も経験する。我々はこの「角膜内皮移植患者の視力不良例」に着目した。角膜内皮移植では、患者角膜は置換されず温存されるため、患者角膜に明らかな混濁や潜在的な混濁がある場合には、それらが視力に影響しているものと考えられる。我々は、広範囲の病変検出が可能である第2次高調波発生顕微鏡を用い、水疱性角膜症の角膜検体におけるコラーゲン線維／線維束構造および角膜実質細胞の表現形の観

察を行い、水疱性角膜症の罹病期間との関連を調査した。また、患者角膜実質が温存される角膜内皮移植の術後視力と術前の水疱性角膜症罹病期間とを比較検討した。我々の一連の研究から、水疱性角膜症が罹病期間依存性の疾患であることが明らかとなり、角膜移植の手術時期の決定やよりよい視力成績を追求した治療方法の開発に有用な情報を提供するに至った。

2. 第2次高調波発生とその角膜組織イメージングへの応用

第2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、金属の表面解析の手法として広く用いられてきた。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 (図1)。金属表面では容易に発生するSHGであるが、生体内に存在する分子でSHGを発生する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。これらのことから、角膜から発生するSHG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。

フェムトセカントレーザを装備したレーザー共焦点顕微鏡を用いて角膜を観察することで、角膜からSHGを励起しコラーゲン線維束のイメージングが可能である。角膜由来のSHGのイメージングでは、検体角膜を2mm四方の小さな角膜片に切り出し顕微鏡にマウントすることでSHG信号を励起可能である。通常の顕微鏡観察では、6~10μm厚の切片を作成し観察するが、この切片作成の過程で組織の立体構造は破壊されてしまう。SHGイメージングでは組織の立体構造を維持したままイメージの描出が可能である点が最大の利点であるといえる。山口大学においては、常盤キャンパス内にあるやまぐちイノベーション創出推進拠点にあるレーザー共焦点顕微鏡システムでSHGを励起しコラーゲンの立体構造を観察することができる。また、角膜組織片は抗原抗体反応を用いた特定たんぱく質の標識も

可能であり、通常の抗体を用いて免疫染色を行い、SHGイメージングの同一検出系を用いて特定たんぱく質のイメージングも可能である。レーザー共焦点顕微鏡を用いるため、得られるイメージは角膜の前額断方向の光学切片となる。図2に、角膜実質層の浅層 (図2A)、中層 (図2B) および深層 (図2C) のSHGイメージを示す。角膜実質各層から励起されたSHGイメージは、層によってその観察像が異

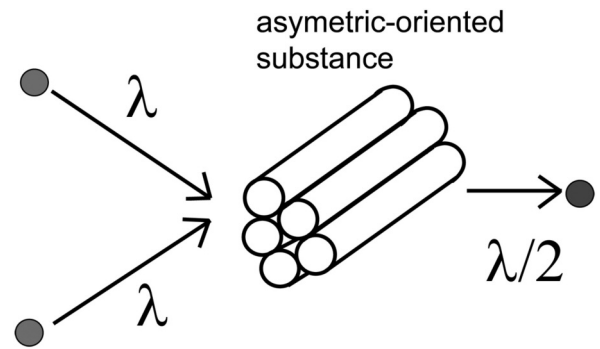


図1 SHGの原理  
波長λを有する2つの光子が非点対称・有極性分子に衝突すると、波長λ/2の1つの光子に変換される。(文献2より改変して転載)

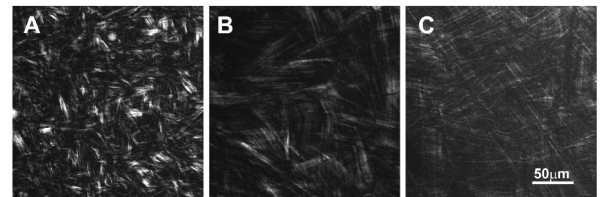


図2 正常ヒト角膜由来のSHGイメージ  
角膜前額断方向のコラーゲン線維/線維束の像である。A:角膜実質浅層, B:角膜実質中層, C:角膜実質深層。(Invest Ophthalmol Vis Sci 48 (3) : 1087-1094, 2007より改変して転載)

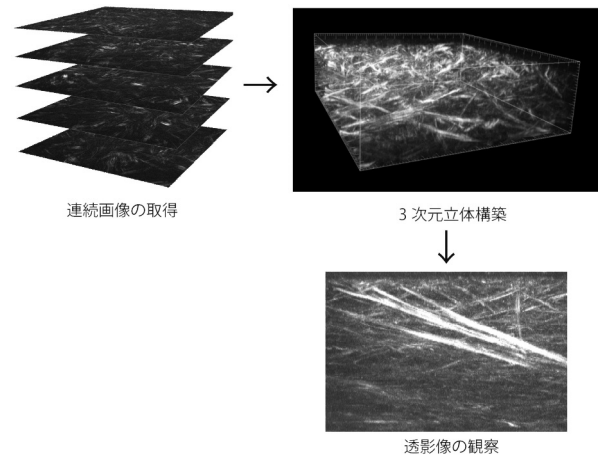


図3 SHGイメージの3次元評価  
連続画像から立体3次元構築を行い、一方向から透過像として観察・表示する。(文献3より改変して転載)

なる。角膜実質浅層由来のSHG信号は、同一方向性を有する短い線維が集簇しているが、中層由来のSHG信号では、観察される線維長も長くなり、集簇する線維（線維束）幅も広くなる。実質深層由来のSHG信号では、さらに線維も長くなり線維束幅も広くなる<sup>1, 2)</sup>。これらのSHG信号イメージは、検出系が共焦点顕微鏡であることから、イメージを連続的にスキャンしデータを取得することができる。得られた連続画像を立体構築し、一側面から観察することにより観察部位の透過像の評価を行う。通常組織評価では数 $\mu\text{m}$ の厚さの評価しかできないが、SHGイメージングによるコラーゲン線維束の観察では、200 $\mu\text{m}$ 以上の厚さの情報を得ることになる（図3）。

### 3. 水疱性角膜症における癥痕性病変の検出

免疫組織学的な検討から、水疱性角膜症眼の角膜実質において異常な細胞外マトリックスの蓄積が見られることが報告されていた<sup>6-8)</sup>。しかしながら、それらの病変が、どのように形成されるかという研究は行われていなかった。我々が特に興味を持ったのは、それらの病変が、どのタイミングで形成されるのか、という点であった。病変が形成されるタイミングは、内皮機能を補充する内皮移植の手術のタイミングを決定する重要な情報であると考えたからである。そこで、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、水疱性角膜症に見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、水疱性角膜症の実質由来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。全層角膜移植で得られた水疱性角膜症検体を対象として評価した。検体角膜の実質浅層由来のSHG信号を採取し立体構築を行うと、正常角膜も水疱性角膜症検体角膜も網目状のコラーゲン線維束構造が観察された（図4 A~4 C）<sup>9, 10)</sup>。水疱性角膜症検体では正常角膜と非常に類似した構造を有する一方で、検体によってはボウマン膜自体にSHG信号の増強を認めたり、ボウマン膜上皮側に異常なSHG信号陽性構造を認めたりするものも観察された（図4 C）<sup>9, 10)</sup>。これらの異常構造は、コラーゲン由来の信号でありまたその存在部位から、癥痕性変化である上皮下線維性組織形成であると考えられた<sup>11)</sup>。また、デスメ膜に近い角膜実質深層の

コラーゲン線維束の立体構造を観察すると、水疱性角膜症検体（図4 E）でも正常角膜（図4 D）と類似した構造を有するものがある一方で、水疱性角膜症検体の中には癥痕形成と考えられる線維束構造の乱れたものもみられることが明らかとなった（図4 F）<sup>10)</sup>。これらの癥痕形成を示すSHG信号は全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見られる傾向にあった<sup>9, 10)</sup>。そこで、水疱性角膜症検体を、角膜実質浅層の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すなわち水疱性角膜症の罹病期間と対比させた。罹病期間の短い検体には上皮下線維性組織形成が見られないのに対し、罹病期間が12ヵ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（図5）<sup>9)</sup>。同一の検体で、細胞骨格・核染

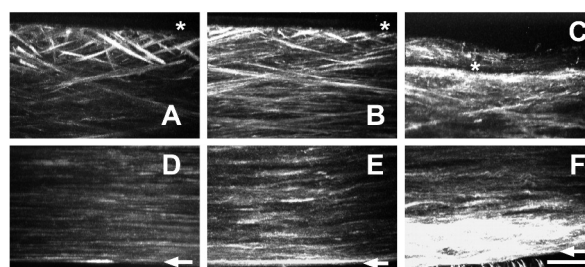


図4 角膜実質浅層 (A~C) および角膜実質深層 (D~F) のSHG立体構築イメージの透過像  
A・D: 正常角膜, B・E: 水疱性角膜症検体 (罹病期間の短いもの), C・F: 水疱性角膜症検体 (罹病期間の長いもの). \*: ボウマン膜, 矢印: デスメ膜. バーは50 $\mu\text{m}$ . (文献10より転載)

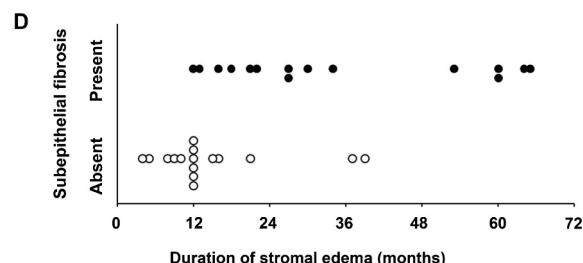
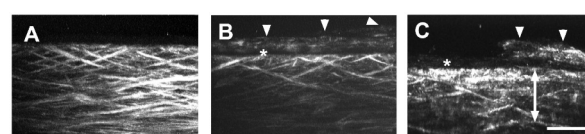


図5 水疱性角膜症の罹病期間と実質浅層の癥痕性変化との関係  
A: 罹病期間12ヵ月の水疱性角膜症検体, B: 罹病期間12ヵ月の水疱性角膜症検体, C: 罹病期間27ヵ月の水疱性角膜症検体 (バーは50 $\mu\text{m}$ ), D: 癥痕性変化の有無と罹病期間の関係, 横軸は水疱性角膜症の罹病期間. (文献9より転載)



色をおこない、角膜実質細胞の形態も観察評価した。水疱性角膜症眼において、正常角膜に見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様形態を示すものが観察された<sup>9)</sup>。これら角膜実質細胞の表現形と水疱性角膜症の罹病期間とを比較評価すると、上皮線維性組織形成と同様に、罹病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見られないのに対し、罹病期間が12ヵ月を過ぎた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(図6)<sup>9)</sup>。これら上皮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、角膜実質の癒痕形成時に発現する筋線維芽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ヵ月を過ぎる検体から筋線維芽細胞が観察されることが明らかとなった(図7)<sup>12)</sup>。角膜実質浅層の評価に加え、角膜実質深層におけるコラーゲン線維束構造異常の出現および筋線維芽細胞の発現の有無を評価したところ、水疱性角膜症罹病期間が12ヵ月を過ぎた検体からそれらの変化が観察されるようになった(図8)。SHG顕微鏡で明らかとなった上皮線維性組織形成、線維芽細胞/筋線維芽細胞の出現は、臨床的実質浮腫発生後12ヵ月を境に有意に増加する事も明らかとなっている<sup>9, 10, 12)</sup>。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すなわち水疱性角膜症罹病期間依存性に病理組織学変化が生じること、すなわち水疱性角膜症は罹病期間依存性に癒痕形成を起こす進行性疾患であると考えられた。

我々が明らかにしてきた水疱性角膜症における癒痕性変化が、実際に我々の施行する角膜内皮移植の術後成績に影響するかどうかを検討した。山口大学医学部附属病院で施行した角膜内皮移植患者のうち、視力不良の原因となりうる要因のない患者28例の術後最高視力を調査し、術前の罹病期間とで比較検討した。術前の罹病期間が短い症例では術後の最高視力が良好な症例が多い(図9, Group A)<sup>13)</sup>のに対し、罹病期間が12ヵ月を過ぎた症例群では術後の最高視力が悪い傾向にあった(図9, Group B)<sup>13)</sup>。角膜内皮移植を受けた症例の角膜の構造を詳細に観察すると、術前罹病期間が短い症例では正常構造を示している(図10A~10C)のに対し、術前罹病期間の長い症例では、上皮線維性組織形成(図10D、

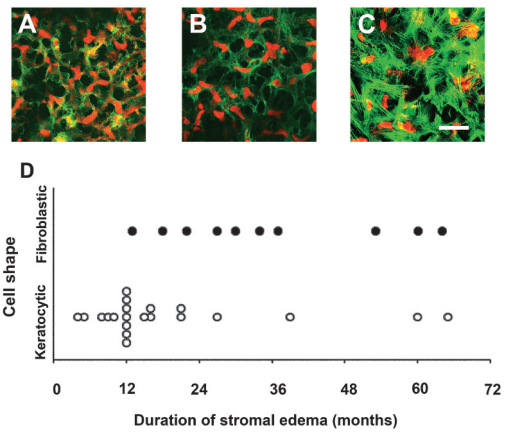


図6 水疱性角膜症の罹病期間と角膜実質細胞の形態変化との関係

A: 正常角膜の角膜実質細胞, B: 罹病期間12ヵ月の水疱性角膜症角膜の角膜実質細胞, C: 罹病期間27ヵ月の水疱性角膜症角膜の角膜実質細胞の線維芽細胞(緑:アクチン, 赤:核, パーは50μm), D: 線維芽細胞出現の有無と罹病期間の関係, 横軸は水疱性角膜症の罹病期間。(文献9より転載)

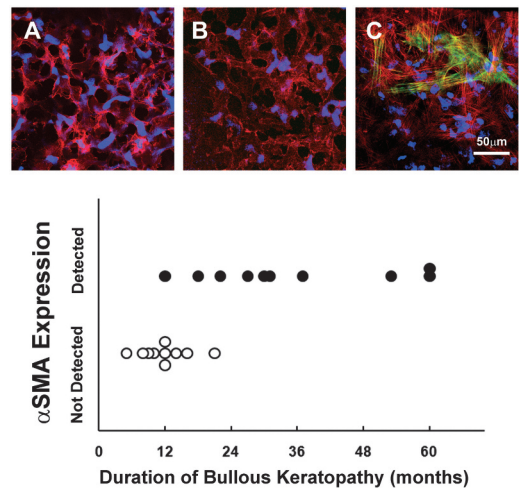


図7 水疱性角膜症の罹病期間と角膜実質における筋線維芽細胞の出現との関係

A: 正常角膜の角膜実質細胞, B: 罹病期間16ヵ月の水疱性角膜症角膜の角膜実質細胞, C: 罹病期間18ヵ月の水疱性角膜症角膜の角膜実質細胞の筋線維芽細胞(緑:α平滑筋アクチン, 赤:アクチン, 青:核), D: 筋線維芽細胞出現の有無と罹病期間の関係, 横軸は水疱性角膜症の罹病期間。(文献12より改変して転載)

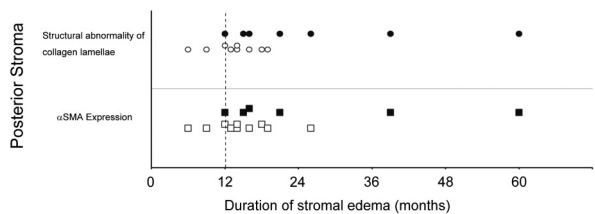


図8 水疱性角膜症の罹病期間と角膜実質深層の癒痕性変化との関係

横軸は水疱性角膜症の罹病期間, 黒塗り印は癒痕性変化または筋線維芽細胞の出現が見られた検体。(文献10より改変して転載)

10E) や実質浅層の線維芽細胞／筋線維芽細胞の発現を示唆する像 (図10F) が観察された<sup>13)</sup>。この検討から、水疱性角膜症における罹病期間依存性の癍痕性変化が角膜内皮移植を行った後の術後視力に影響することが明らかとなった。

我々は、水疱性角膜症という角膜に浮腫性変化を来す疾患における癍痕性変化の検出に着目して、研究を行った。浮腫性疾患であるから浮腫を改善すれば問題は解決する、と考えられていた水疱性角膜症という疾患に対する考え方に、罹病期間依存性の癍痕形成という概念を加えるに至った。自身らの研究結果に基づき、当院における角膜内皮移植は水疱性

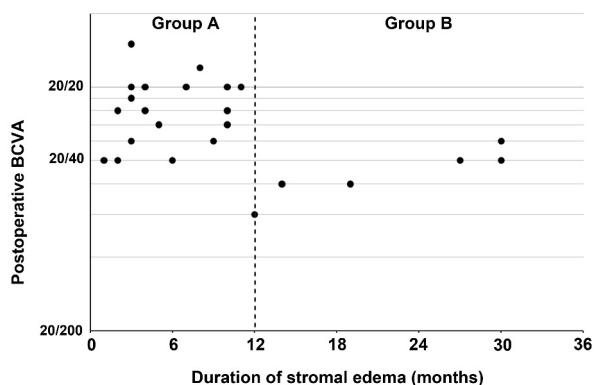


図9 角膜内皮移植術後の最高視力 (Best corrected visual acuity: BCVA) と術前の水疱性角膜症罹病期間との関係

縦軸は経過観察期間中の最高矯正視力、横軸は術前の水疱性角膜症罹病期間。罹病期間が短いGroup Aでは良好な視力が得られているのに対し、罹病期間の長いGroup Bでは良好な視力が得られた症例がない。(文献13より転載)

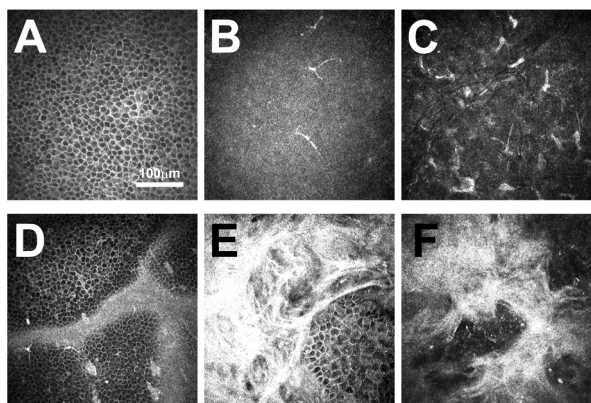


図10 生体共焦点顕微鏡を用いた角膜内皮移植術後角膜の観察

A・D: 角膜上皮基底細胞層, B・E: 角膜上皮基底細胞層～ボウマン膜, C・F: 角膜実質浅層。術前の水疱性角膜症罹病期間の短い角膜 (A～C) では、異常な構造を認めないのに対し、術前の罹病期間の長い角膜 (D～F) では癍痕性変化が観察される。(文献13より転載)

角膜症発症後1年以内に施行する方針で治療を行っている。また、我々の報告に基づき、角膜内皮移植後の癍痕形成を除去する治療を開始している研究グループもある<sup>14, 15)</sup>。これまで地道に行ってきた研究が実際の臨床に役立てることができたこと、また自身以外の研究グループに対し我々の報告が有用な情報を提供したことは、臨床を目標とする研究者にとっては非常に感慨深い。今後も継続した研究を行い、さらなる疾患概念の理解と病態解明へとつなげていきたいと考えている。

稿を終えるにあたり、長年にわたり臨床・研究のご指導いただいた西田輝夫先生 (山口大学副学長)、研究を温かく支援くださった園田康平先生 (山口大学大学院医学系研究科眼科学教授)、研究機器の使用を快くご許可くださった高原 淳先生 (九州大学先端物質研究所教授) に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) Morishige N, Takagi Y, Chikama T, et al. 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* 2011; 52: 911-915.
- 2) Morishige N, Nishida T, Jester JV. Second harmonic generation for visualizing 3-dimensional structure of corneal collagen lamellae. *Cornea* 2009; 28: S46-S53.
- 3) 森重直行. 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. *日本眼科学会雑誌* 2011; 115: 1025-1035.
- 4) Boimer C, Lee K, Sharpen L, et al. Evolving surgical techniques of and indications for corneal transplantation in Ontario from 2000 to 2009. *Can J Ophthalmol* 2011; 46: 360-366.
- 5) Price MO, Price FW. Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 290-294.
- 6) Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowsky RJ, et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 997-1007.

- 7) Ljubimov AV, Saghizadeh M, Pytela R, et al. Increased expression of tenascin-C-binding epithelial integrins in human bullous keratopathy corneas. *J Histochem Cytochem* 2001 ; **49** : 1341-1350.
- 8) Ljubimov AV, Saghizadeh M, Spirin KS, et al. Expression of tenascin-C splice variants in normal and bullous keratopathy human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 ; **39** : 1135-1142.
- 9) Morishige N, Yamada N, Teranishi S, et al. Detection of subepithelial fibrosis associated with corneal stromal edema by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009 ; **50** : 3145-3150.
- 10) Morishige N, Yamada N, Zhang X, et al. Abnormalities of stromal structure in the bullous keratopathy cornea identified by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012 ; **53** : 4998-5003.
- 11) Eagle RC Jr., Laibson PR, Arentsen JJ. Epithelial abnormalities in chronic corneal edema : a histopathological study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1989 ; **87** : 107-119.
- 12) Morishige N, Nomi N, Morita Y, et al. Immunohistofluorescence analysis of myofibroblast transdifferentiation in human corneas with bullous keratopathy. *Cornea* 2011 ; **30** : 1129-1134.
- 13) Morishige N, Chikama T, Yamada N, et al. Effect of preoperative duration of stromal edema in bullous keratopathy on early visual acuity after endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2012 ; **38** : 303-308.
- 14) Awdeh RM, Abbey AM, Vroman DT, et al. Phototherapeutic keratectomy for the treatment of subepithelial fibrosis and anterior corneal scarring after descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2012 ; **31** : 761-763.
- 15) Patel SV, Baratz KH, Maguire LJ, et al. Anterior Corneal Aberrations after Descemet's

Stripping Endothelial Keratoplasty for Fuchs' Endothelial Dystrophy. *Ophthalmology* 2012 ; **119** : 1522-1529.

## Detection and Clinical Impact of Corneal Stromal Scarring in Bullous Keratopathy

Naoyuki MORISHIGE

Department of Ophthalmology (Ophthalmology), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

### SUMMARY

The pathogenesis of bullous keratopathy is corneal endothelial decompensation, resulting that the clinical appearance of bullous keratopathy is corneal stromal edema. Currently, the treatment trend for bullous keratopathy is changing from penetrating keratoplasty to corneal endothelial keratoplasty, which requires stromal transparency of patients' cornea. Thus we detected corneal stromal scar formation in bullous keratopathy by applying Second Harmonic Generation Imaging Microscopy for observing corneal stroma collagen lamellae structure and the phenotypes of corneal stromal cells. Furthermore, we analyzed the relationship between pathological changes in bullous keratopathy corneas and stromal edema duration. Our observation revealed that stromal edema duration affected to the appearance of scar formation in corneal stroma of bullous keratopathy and it also affected to the post operative visual acuity of corneal endothelial keratoplasty. Our pathological and clinical analysis demonstrated that bullous keratopathy is stromal edema duration-dependent progressive disease.