

ミニ・レビュー

生体共焦点顕微鏡による
糖尿病患者角膜上皮基底膜の異常散乱光検出

森重直行

山口大学医学部分子制御系・眼科学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 角膜, 糖尿病, 共焦点顕微鏡, 基底膜, 糖尿病網膜症

緒言

現在, 糖尿病または糖尿病が強く疑われるものは, 日本に1300万人いるといわれている¹⁾. 増加する糖尿病患者の管理上, 糖尿病自体の管理と糖尿病慢性合併症の管理が患者の生命予後および生活の質QOLの維持のために重要である. 糖尿病患者の16%に眼科的慢性合併症である糖尿病網膜症が発症すると報告されており²⁾, 他の先進国と同様, 日本における中途失明の原因の第1位は糖尿病網膜症となっている³⁾. 糖尿病網膜症の治療の目標は, あくまで現在の視力を維持することであるので, 良好な視力維持には糖尿病の眼合併症の早期発見がもっとも大切であることは他の慢性糖尿病合併症の管理と同様である.

糖尿病網膜症の病因には, 網膜血管の閉塞が重要であり, その背景には網膜血管内皮細胞自体の脆弱化に加え, 血管内皮基底膜の変化に伴う血管の脆弱性が考えられる⁴⁾. この基底膜変化は網膜症に限らず, 眼科的には角膜上皮基底膜にも変化が生じることは従来いわれている^{4,5)}. 特に, 糖尿病患者における角膜障害は手術や外傷など, 何らかのストレス後に発症することが多く, 糖尿病角膜症 Diabetic keratopathy と呼ばれており⁶⁾, これまで我々は, 創傷治癒過程における角膜上皮基底膜を構成する細胞外マトリックスの発現の差を報告した⁷⁾. 糖尿病網

膜症とは異なり, 糖尿病角膜症では不可逆性の著しい視力低下をきたすことはないが, 角膜の混濁により軽度の視力低下をきたしたり, 眼底管理の妨げになったりする. 糖尿病角膜症は臨床的に重要な疾患であり, 糖尿病慢性合併症の病態理解に重要な疾患と考えられる.

共焦点原理を応用した共焦点顕微鏡が眼科臨床に応用され⁸⁾, さまざまな角膜疾患に対し, 細胞レベルの観察を用いてその病態解明にアプローチしてきた. この生体共焦点顕微鏡を用いて角膜を観察すると, 細胞レベルの観察や, 角膜の構成成分から得られる反射散乱光を検出できる (Z-Scan). このZ-Scanは従来の角膜の観察方法とは異なり, ユニークな方法である.

今回我々は, 糖尿病患者角膜にZ-Scanを適用し, 角膜上皮基底膜部分の散乱光を検出し, その散乱が糖尿病網膜症の重症度と相関することを見出した. 本稿では, この研究結果および眼科臨床における生体共焦点顕微鏡の眼科臨床応用について報告する.

方法と対象

1998年4月から1999年10月にかけて, 当科を受診した糖尿病患者 (DM) 65名 (男性39名, 女性26名, 年齢25~83歳, 平均 62.1 ± 11.7 歳) および同時期に当科を受診した非糖尿病患者 (NDM) 18名 (男性12名, 女性6名, 年齢26~83歳, 平均 58.9 ± 19.2 歳) を対象とした. 糖尿病患者においては, Davis分類

平成14年8月5日受理

に基づき非糖尿病網膜症 (NDR) 16例, 単純糖尿病網膜症 (SDR) 20例, 前増殖糖尿病網膜症 (PPDR) 13例および増殖糖尿病網膜症 (PDR) 16例に分類した。各対象からinformed consentを得た後に生体共焦点顕微鏡検査を施行した。

生体共焦点顕微鏡にはConfoScan® (Tomey) を用いた。各対象の両眼に局所麻酔剤 (塩酸オキシブプロカイン) を点眼した後, 接眼レンズに反射光の散乱を減少させるためのcoupling gel (Vidisc eye gel; Mann Pharma, Berlin, Germany) を塗布して対象者の両眼の角膜を観察し, 右眼のZ-Scan waveを測定した。右眼に眼内手術が行われている場合には, 左眼のZ-Scan waveを測定した。

生体共焦点顕微鏡検査時に得られたZ-Scan waveの典型的な波形を図1に示す。Z-Scanでは, 3つのピークを持つ波形が得られる。最初のピークが涙液-上皮移行部のピーク (図1中の矢印A), 第2のピークが上皮基底膜部分のピーク (図1中の矢印B), 第3のピークが角膜内皮-前房移行部のピーク (図1中の矢印C) である。第2ピークから第3ピークにかけてのplateau部分は角膜実質を示している。得られたZ-Scan waveのうち, 涙液-前房の散乱光強度をベースラインとして, ベースラインから角膜上皮の散乱光強度の差をaとし, ベースラインから角膜上皮基底膜部分の散乱光強度の差をbとし, その比 b/a をLSIと定義した。各対象群のLSIを算出し, 平均値を算出, NDM群と比較した。統計計算にはStudent's *t*-testを用いた。

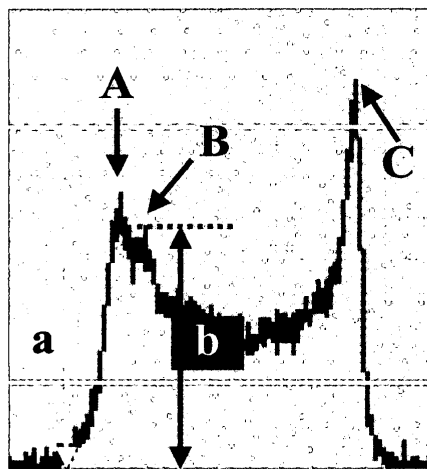


図1. Z-Scan waveとLSIの算出。A: 涙液-上皮移行部, B: 上皮基底膜部分, C: 内皮-前房移行部。涙液-上皮移行部の高さをa, 上皮基底膜部分の高さをbとし, b/a をlight Scattering Index; LSIと定義した。

結 果

図2に, 対照群であるNDM群とPDR群のZ-Scan waveの典型例を示す。NDM群のZ-Scan wave (図2-A) では第2ピークが第1ピークに比べて低いのにに対し, PDR群のZ-Scan wave (図2-B) では第2ピークが第1ピークに比べて高くなっていた。得られたZ-Scan waveの対象群別LSIの平均値を表1に示す。非糖尿病患者であるNDM群のLSIは 0.81 ± 0.13 であったのに対し, 糖尿病患者全体であるDM群のLSIは 0.93 ± 0.17 でNDM群に比べ有意にLSIが高かった。また, DM群のうち, NDR群, SDR群, PPDR群, PDR群の平均LSIはそれぞれ 0.87 ± 0.09 , 0.90 ± 0.09 , 0.90 ± 0.13 , 1.02 ± 0.20 で, 糖尿病網膜症の重症度に従い増加する傾向にあった。統計学的には, SDR群およびPDR群ではNDM群と比較して有意にLSIが増加していた。

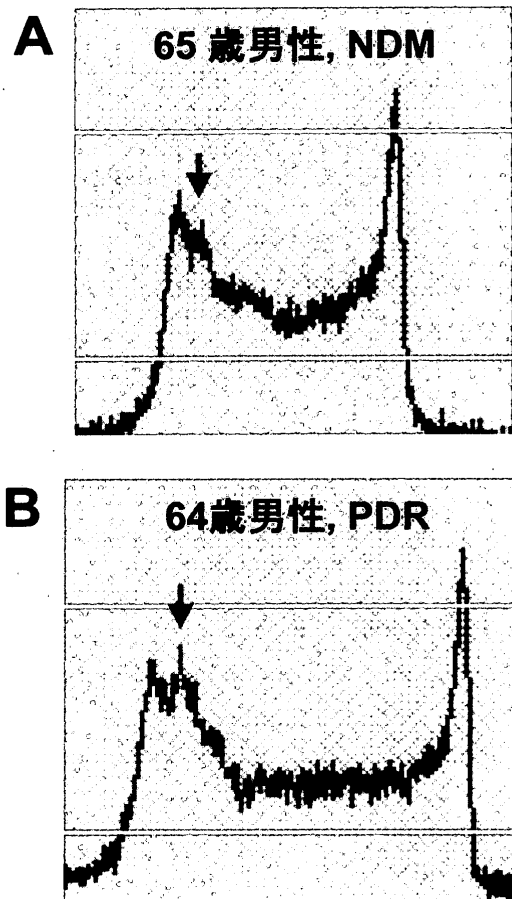


図2. 非糖尿病対照者と糖尿病患者のZ-Scan wave。A: 非糖尿病 (NDM) 対照者 (65歳男性) ではLSIが 0.86 であったのに対し, B: 増殖糖尿病網膜症 (PDR) 患者 (64歳男性) ではLSIが 1.07 であった。

Group	LSI	眼数	対照群に対するp値
NDM群	0.81±0.13	18	
DM群	0.93±0.17	65	0.015
NDR	0.87±0.09	16	NS ^a
SDR	0.90±0.09	20	0.021
PPDR	0.90±0.13	13	NS
PDR	1.02±0.20	16	0.001

a : Not significant

表1. 各群におけるLSIの平均値の比較

考 按

本研究により、生体共焦点顕微鏡を用いた角膜上皮基底膜部分の散乱強度を示すLSIが、糖尿病患者において増加していることが明らかとなった。本研究の特異な点は、①生体において基底膜変化を検出できる可能性があること、②共焦点光学系を用いたユニークで非侵襲的な検出系により観察可能であることの2点である。

本研究で提唱したLSIは、角膜上皮から角膜実質の移行部の散乱光を検出している。解剖学的には、この部分には、角膜上皮基底膜とBowman膜と呼ばれる組織が存在する。糖尿病動物および糖尿病患者角膜では、角膜上皮基底膜において、基底膜の肥厚や粗造などの異常が報告されている⁴⁵⁾。我々の測定しているLSIは、この形態学的異常をきたした上皮基底膜由来の異常散乱を検出しているのではないかと考えている。塑造や肥厚を来している基底膜をスキャンした場合、その部分では光の散乱が増強すると考えられるからである。角膜上皮基底膜の異常に由来する光の散乱は非常に弱く、患者本人が日常生活で経験する程度のものではないが、生体共焦点顕微鏡を用いたZ-Scanで観察することによりその異常散乱を検出できたものと推測される。現時点では糖尿病患者における散乱光の波形異常という現象を検出したに過ぎないが、今後更なる研究により我々の仮説を証明できれば、全身に存在するあらゆる組織内の基底膜の異常を角膜という組織で検出できる可能性がある方法であると思われる。

従来眼科臨床で使用されている細隙灯顕微鏡は最大40倍までの拡大しかできないのに対し、生体共焦点顕微鏡を用いると最大1000倍の高倍率で観察が可能である。この生体共焦点顕微鏡を用いることで、

角膜疾患を従来とは異なった観点から検討することが可能となった。これまで我々は、神経麻痺性角膜症の治療後に神経線維の再生を確認したり⁹⁾、感染性角膜炎の患者角膜内に多核白血球の浸潤を確認したり、従来の方法では評価が困難であった角膜疾患における角膜内皮細胞の評価の有用性を見出したりした(未発表)。これらの我々の報告は、組織散乱光を測定するZ-Scanと異なり、画像解析装置としての生体共焦点顕微鏡の特徴を発揮した報告である。生体共焦点顕微鏡は非侵襲的に生体角膜の構成成分の像を得ることができるため、太さ数 μm の神経線維の観察も可能である。生体角膜の恒常性維持に神経性因子の関与が重要であることは従来からいわれており^{10,11)}、実際に神経性因子なくしては治療不可能な患者に遭遇することも経験される¹²⁾。したがって、非侵襲的に角膜知覚神経線維が観察できることは、今後の角膜の生理機能、特に神経系の制御機構を解明するのに重要な方法となると思われる。

本稿では、糖尿病患者で検出された角膜上皮基底膜部分の異常散乱光とその評価方法を概説した。生体共焦点顕微鏡の臨床応用が進み、角膜疾患のみならず全身疾患の病態解明へのアプローチがなされるように、今後とも研究を継続していきたいと考える。

謝 辞

本論文は山口大学医学会小西賞受賞講演(平成14年7月20日)を記録したものである。本研究に対してご指導いただいた山口大学医学部分子感知医科学西田輝夫教授ならびにご協力いただいた山口大学医学部分子感知医科学眼科学の諸兄姉に心より感謝の意を捧げる。

引用文献

- 1) 佐々木陽. 本邦における糖尿病有病率の動向と国際比較. 日本臨床 1999; 3: 492-495.
- 2) 中江公裕, 小暮文雄, 長屋幸郎, 三島濟一. 我が国における視覚障害の現況. 厚生指標 1991; 38, 13-22.
- 3) 石橋達朗. 眼内血管病変の細胞生物学. 日眼会誌 1999; 103: 923-947.
- 4) Taylor HR, Kimsey RA. Corneal epithelial

- basement membrane changes in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981 ; **20** : 548-553.
- 5) Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Altered epithelial-basement membrane interaction in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol* 1992 ; **110** : 537-540.
 - 6) Schultz RO, VanHorn DL, Peters MA, Klewin KM, Schutten WH. Diabetic keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1981 ; **79** : 180-199.
 - 7) Sato N, Nakamura M, Chikama T, Nishida T. Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats. *Jpn J Ophthalmol* 1999 ; **43** : 343-347.
 - 8) Wiegand W, Thaer AA, Kroll P, Geyer OC, Garcia AJ. Optical sectioning of the cornea with a new confocal in vivo slit-scanning videomicroscope. *Ophthalmology* 1995 ; **102** : 568-575.
 - 9) Morishige N, Komatsubara T, Chikama TI, Nishida T. Direct observation of the corneal nerve fibres in neurotrophic keratopathy by confocal biomicroscopy. *Lancet* 1999 ; **354** : 1613-1614.
 - 10) Magendie PA. De l'influence de la cinquieme paire de nerfs sur nutrition et les fonctions de l'oeil. *J Physiol (Paris)* 1824 ; **4** : 176-177.
 - 11) 西田輝夫. 神経麻痺性角膜症 - 角膜知覚の臨床的意義に関する細胞生物学的研究 -. *日眼会誌* 1997 ; **101** : 948-974.
 - 12) Chikama T, Fukuda K, Morishige N, Nishida T. Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulin-like growth factor I. *Lancet* 1998 ; **351** : 1783-1784.

Abnormal Light Scattering in the Corneas in Diabetic Patients – A new Approach to the Diagnosis of Diabetic Complications with Confocal Biomicroscopy –

Naoyuki MORISHIGE

*Dept of Ophthalmology. and. Biomolecular Recognition
Yamaguchi University School of Medicine
1-1-1, Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi, 755-8505, Japan*

SUMMARY

Diabetic complications threaten the quality of life of individuals with diabetes and therefore represent an important clinical problem. An abnormality of basement membranes is thought to contribute to the pathogenesis of diabetic complications. Diabetic complications that affect the eye include diabetic retinopathy, diabetic cataract, and diabetic keratopathy, the latter of which is thought to arise as a result of hyperglycemia-induced changes in corneal cell function and the corneal epithelial basement membrane. The human cornea can be examined with a confocal microscope, the Z-Scan mode of the ConfoScan® model of which allows the measurement of tissue reflectivity for all layers of the cornea. We defined the light scattering index (LSI) as the ratio of tissue reflectivity of the corneal epithelial basement membrane to that of corneal superficial cells, and we measured this parameter in individuals with type II diabetes and control subjects with the use of the Z-Scan mode of the ConfoScan®. The LSI was increased in the diabetic subjects compared with that in controls. Furthermore, the LSI was shown to be correlated with the severity of diabetic retinopathy in the subjects with diabetes. Our results suggest that confocal microscopy may provide a means of detecting systemic basement membrane abnormalities.