

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591934

研究課題名（和文） 水疱性角膜症に対する新しい角膜内皮移植術（nDSAEK）の開発と包括的視機能解析

研究課題名（英文） Development of novel endothelial keratoplasty (nDSAEK) for bullous keratopathy and its visual function analysis

研究代表者

小林 顕 (KOBAYASHI AKIRA)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20303274

研究成果の概要（和文）：研究計画に従い、角膜内皮移植術後患者におけるドナー接着因子に関する研究を行った。具体的には、DSAEK(Descemet stripping automated endothelial keratoplasty)とnDSAEK(non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty)を受けたそれぞれの患者群における臨床成績とドナーの接着状況をレトロスペクティブに統計学的に解析した。その結果、術後 6 カ月、1 年の時点で裸眼矯正視力、眼鏡矯正視力に有意差はなく、内皮細胞密度、内皮細胞密度減少率においても統計学的な有意差は認めなかった。さらに、ドナーの接着率に関しても統計的な有意差は認めなかった。共焦点顕微鏡（In vivo laser confocal microscopy, Heidelberg Retina Tomograph II, Rostock cornea module）による生体組織解析では、DSAEK 後に認められる上皮下混濁、実質の針状沈着物、ドナーレシピエント層間混濁、ドナーレシピエント層間沈着物に加えて、nDSAEK 後には、巨大な高輝度ドナーレシピエント層間沈着物が認められた。この巨大高輝度沈着物は圧迫されて壊死した宿主角膜内皮細胞と推測されたが、nDSAEK 後のドナーの接着や、術後矯正視力には、影響を与えないことが確認された。

研究成果の概要（英文）：According to a research project, we conducted a research to compare the clinical results after DSAEK(Descemet stripping automated endothelial keratoplasty)and nDSAEK(non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty). As a result, no statistical difference was observed between these two groups in terms of the visual acuity, and best corrected visual acuity, endothelial cell density. Also, no difference was observed for donor adherence rate. In vivo laser confocal microscopy revealed that subepithelial opacity, stromal needle shaped bodies, donor recipient interface opacity and particles. Most notably, giant hyperreflective materials were observed at donor recipient interface only in nDSAEK group; these were considered to be necrotic and aggregated host endothelial cells and seemed to have no side effect to postoperative visual acuity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
2013 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学
キーワード：角膜移植、角膜内皮移植

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮細胞が様々な原因で傷害されると、角膜が浮腫状に混濁して視力が極端に低下し、最終的に激しい痛みを伴う水疱性角膜症を発症する。これまでは「全層」角膜移植術が唯一の根治的手術療法であった。ただし、本術式は角膜全層切開に起因する眼球の脆弱性、縫合糸に関連した感染症、拒絶反応、高度角膜乱視、術中駆出血など様々なリスクを伴っている。近年、角膜内皮のみを交換する手術（角膜内皮移植術）が可能となり、様々な術式の改良を経て、現時点では DSAEK (Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) が水疱性角膜症に対する第一選択の手術術式として欧米を中心に行われている。DSAEK とは、ホスト角膜のデスメ膜と内皮の除去を行った後に、マイクロケラトームで作成した厚さ約 100 μ m のドナー角膜を角膜切開部から前房内に挿入し、空気タンポナーデでホスト角膜実質裏面に接着させる手術である。角膜上が無縫合であり、縫合糸感染や縫合糸関連拒絶反応が生じない。角膜前方のカーブが保たれるため惹起乱視が僅かである。また強角膜小切開で手術が可能のため、従来の全層角膜移植に比較して外傷にも強い。さらに視力の回復も格段に早く、自験例でもほぼ全例で 0.5 以上の矯正視力が短期間で得られている。DSAEK においては以上のような多くのメリットが認められる。研究代表者は本邦で初めて DSAEK を導入し (2006 年)、更に DSAEK についての数多くの招待講演や、多くの国立私立大学眼科、眼科病院施設 (20 か所以上) における DSAEK 導入指導の実績がある。DSAEK の際にはホストのデスメ膜の剥離除去を行うが、これは欧米においては羞明や視力低下の原因となりうるグッタータ (デスメ膜の疣状突起) を特徴とするフックス角膜ジストロフィが多いためである。研究代表者は、本邦においてはフックス角膜ジストロフィが稀であるため、デスメ膜を剥離除去する意義は少ないと考え、2008 年にホストデスメ膜を剥離除去しない新しい術式を考案し、nDSAEK (non-Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) と命名し、多くの患者においてその臨床的有用性と、DSAEK に比較した術後視力の優位性を確認した。

近年、波長 670nm のダイオードレーザーを光源とする、超高解像の角膜専用生体共焦点顕微鏡 (HRT II ロストック角膜モジュール、以下 HRT II-RCM、ハイデルベルグ社) が開発され、細胞レベルでの生体観察が可能となり、2005 年に本邦第一号機が金沢大学眼科に導

入された。研究代表者はこれまでに、眼科領域 (特に角膜疾患) における生体共焦点顕微鏡の臨床応用を行い、国内学会や海外主要学会 (米国視覚研究者会議 ARVO や、米国眼科臨床学会 AAO など)、海外一流眼科雑誌にも 20 報以上の報告を行ってきた。本装置を用いて DSAEK 後角膜を経時的に観察し、上皮下混濁、実質における針状沈着物、ホストドナー層間混濁、層間沈着物など、臨床的には観察できない超微細病的所見が見られることを世界で初めて報告し、また、nDSAEK 後には、DSAEK と同様の所見以外に、ホストドナー層間に巨大高輝度沈着物が観察されることを発見した。これらの臨床実験結果とこれまでの多数の臨床経験 (本邦最多) から、ホストデスメ膜を剥離除去しないことによる術後の視機能への影響や DSAEK と比較した優位性、デスメ膜の有無によるドナーホスト間の接着機構の違いなどに対する疑問が生じ、それらが本研究を着想する動機となった。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、研究代表者が開発した新しい角膜内皮移植術 (デスメ膜非剥離角膜内皮移植術: nDSAEK 後の角膜について、レーザー共焦点顕微鏡や前眼部光干渉断層計などを用いた超微細構造の詳細な生体解析 (2 次元および 3 次元構造) とその経時的变化の解析を行い、術後視機能との関連性を調べ、従来の手術と比較した nDSAEK の優位性とその科学的な根拠を探ることである。また、ドナー角膜がホスト角膜裏面に無縫合で空気タンポナーデのみで接着される機序の解明を目的として、動物眼を使用した基礎実験を行う。これらの研究を通して、より優れた術後視機能を得ることができる新たな角膜内皮移植術の開発を目指す。

3. 研究の方法

計画 1. レーザー共焦点顕微鏡を用いた nDSAEK 後角膜の 2 次元構造の解析

対象はそれぞれ 50 人の nDSAEK 後患者と DSAEK 後患者である。HRT II RCM を用いて、角膜中央の生体観察を角膜上皮、実質、ホストドナー層間、ドナー角膜実質、ドナー内皮の各レベルにおいて広範囲に行う。対象眼を塩酸オキシブプロカインで表面麻酔した後、角膜に HRT2-RCM のレンズキャップを接触させ、角膜中央部における前述した様々な深さで、可能な限り広範囲にスキャンを行う。得られる 2 次元画像は 1 枚当たり 384 \times 384 ピクセルの解像度を持ち、これは角膜上の 0.4 \times 0.4 mm の範囲に相当する。得られた多数のイメージをコンピュータプログラム (Adobe Photoshop; Adobe Systems, San

Jose, CA, USA) を用いて結合し、広範囲モニターグラフィックを作成する。更にコンピュータプログラム (Adobe Photoshop) を用いて画像データの電子トレース像を作成し、2次元構造を解析する。また、コンピュータプログラム (Image-Pro Express; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) を用いてホスト、ドナーそれぞれの実質、内皮、点状層間高輝度沈着物、巨大層間高輝度沈着物の密度を計算する。得られた結果に再現性があるかどうかを検討するために、同一被検者につき、異なる日を用いて最低2回は実験を行った。

計画2. nDSAEK後角膜におけるホストドナー層間境界面付近の3次元構造の解析対象はそれぞれ50人のnDSAEK後患者とDSAEK後患者である。HRTII-RCMの画像取り込みモードのうち、ボリュームモードを使用することによって、40枚の連続した焦点面のシリーズ画像を約2 μ mの間隔で取り込むことが可能である。各対象について、ホストドナー層間境界面を含むレベルにおいて、角膜中央、周辺部(輪部)でそれぞれ連続画像のスタック(積み重ね)を作成し、コンピュータプログラム(NIH imageとAMIRA software)を用いて3-D構造を再構築し、残存したデスメ膜の厚さや輝度、高輝度点状・巨大沈着物の密度など、各種スペックについて解析を行った。

計画3. DSAEK/nDSAEK後の他覚的視機能の解析

対象はそれぞれ50人のnDSAEK後患者とDSAEK後患者、全層移植後患者である。これらの患者において、術後1、3、6、12カ月後に術後視力、角膜内皮細胞密度とその減少率、コントラスト感度測定、高次収差(オクルス社製前眼部解析装置ペンタカムを使用)、眼圧の測定を行い、他覚的な視機能検査を行う。得られたデータについて、Statviewソフトウェアを用いた統計解析を行い、DSAEKとnDSAEK後、全層角膜移植術後患者群間の視機能に差があるかどうかを評価した。

計画4. DSAEK/nDSAEK後の自覚的視機能の解析

対象はそれぞれ50人のnDSAEK後患者とDSAEK後患者、全層移植後患者である。これらの患者において、術後3カ月以上経過した時点において、The National Eye Institute Visual Function-25 (VFQ-25)日本語版を用いて術後の視覚関連機能を検討する。VFQ-25日本語版は、すでに信頼性と妥当性が確認され、眼手術による視覚機能改善の評価に使用されている。得られたVFQ25の総合スコアについて、Statviewソフトウェアを用いた統計解析を行い、各群間での比較とその他の眼科手術における過去のデータとの比較を行う。

4. 研究成果

DSAEK/nDSAEK術後6カ月、1年の時点で

裸眼矯正視力、眼鏡矯正視力に有意差はなく、内皮細胞密度、内皮細胞密度減少率においても統計学的な有意差は認めなかった。さらに、ドナーの接着率に関しても統計的な有意差は認めなかった。共焦点顕微鏡(In vivo laser confocal microscopy, Heidelberg Retina Tomograph II, Rostock cornea module)による生体組織解析では、DSAEK後に認められる上皮下混濁、実質の針状沈着物、ドナーレシピエント層間混濁、ドナーレシピエント層間沈着物に加えて、nDSAEK後には、巨大な高輝度ドナーレシピエント層間沈着物が認められた。この巨大高輝度沈着物は圧迫されて壊死したホスト角膜内皮細胞と推測されたが、nDSAEK後のドナーの接着や、術後矯正視力には、影響を与えないことが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17件)

1. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings of Thygeson's superficial punctate keratitis. *Cornea* 2011;30:675-680. (DOI: 10.1097/ICO.0b013e318200099d)

2. Mawatari Y, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Intraocular pressure after Descemet stripping and non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55:98-102 (DOI:10.1007/s10384-010-0916-8)

3. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui T, Amano S, Yokogawa H, Kobayashi A, Shiraiishi A, Ohashi Y, Inatomi T, Kinoshita S, Tsubota K. Mathematical projection model of corneal endothelial cell loss due to Fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7888-7893. (DOI: 10.1167/iovs.11-8040)

4. Kobayashi A, Yokogawa H, Higashide T, Nitta K, Sugiyama K. Clinical significance of owl eye morphologic features by in vivo laser confocal microscopy in patients with cytomegalovirus corneal endothelitis. *Am J Ophthalmol* 2012; 153(3):445-453. (DOI: 10.1016/j.ajo.2011.07.026)

5. Yokogawa H, Kobayashi A, Sugiyama K. Clinical evaluation of the Tan EndoGlide, a

new donor inserter for Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2012;43(1):50-56
(DOI: 10.3928/15428877-20111129-08)

6. Masaki T, Kobayashi A, Yokogawa H, Saito Y, Sugiyama K. Clinical Evaluation of non-Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (nDSAEK) *Jpn J Ophthalmol* 2012;56(3) 203-207.
(DOI: 10.1007/s10384-012-0123-x)

7. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Clinical Results of the Neusidl Corneal Inserter, a New Donor Inserter for Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty, for Small Asian Eyes
Ophthalmic Surg Lasers Imaging 2012;43 (4) :311-318.
(DOI: 10.3928/15428877-20120426-04)

8. Toshida H, Ohta T, Murakami A, Kobayashi A, Sugiyama K. Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Microcornea. *Jpn J Ophthalmol* 2012; 56(5) 436-440.
(DOI: 10.1007/s10384-012-0163-2)

9. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. No Touch Technique and a New Donor Adjuster for DSAEK. *Case Rep Ophthalmol* 2012;3(2):214-220
(DOI: 10.1159/000339835)

10. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings in patients with map-dot-fingerprint dystrophy (epithelial basement membrane dystrophy) *Clinical Ophthalmol* 2012;6 1187-1190.
(DOI: 10.2147/OPHTH.S34196)

11. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Management of a small paracentral corneal perforation using iatrogenic iris incarceration and tissue adhesive. *Case Report Ophthalmol* ; 2012;3(2) 226-229.
(DOI: 10.1159/000341094)

12. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. A sliding technique to load thin endothelial donor lamella onto Busin glide for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Clinical Ophthalmol* 2012;6 1229 – 1231.

(DOI: 10.2147/OPHTH.S34197)

13. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K.
Bowman's layer encystation in cases of persistent Acanthamoeba keratitis *Clinical Ophthalmol* 2012;6 1245–1251.
(DOI: 10.2147/OPHTH.S34197)

14. Yamazaki N, Kobayashi A, Yokogawa H, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K. Ex vivo laser confocal microscopy findings of cultured Acanthamoeba trophozoites. *Clinical Ophthalmol* 2012;6 1365–1368.
(DOI: 10.2147/OPHTH.S35258)

15. Morita K, Gao Y, Saito Y, Higashide T, Kobayashi A, Ohkubo S, Sugiyama K. In vivo confocal microscopy and ultrasound biomicroscopy study of filtering blebs after trabeculectomy: limbus-based versus fornix-based conjunctival flaps. *J Glaucoma*. 2012 Aug;21(6):383-91.
(DOI: 10.1097/IJG.0b013e3182120a08)

16. Matsumoto Y, Ohashi Y, Watanabe H, Tsubota K; Diquafosol Ophthalmic Solution Phase 2 Study Group (Kobayashi A, et al) . Efficacy and safety of diquafosol ophthalmic solution in patients with dry eye syndrome: a Japanese phase 2 clinical trial. *Ophthalmology*. 2012 Oct;119(10):1954-60.
(DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.04.010)

17. Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy after Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2013;120(5) 923-930.
(DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.11.006)

〔学会発表〕 (計 16 件)
正木利憲、小林 颯、横川英明、杉山和久 ア
ルゴンレーザー虹彩切開術後水疱性角膜症
における nDSAEK の術後成績
第 35 回日本角膜学会総会 2011 年 2 月 18
日 東京 品川プリンスホテル

Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. The Usefulness of no touch technique for DSAEK donor centering and development of donor adjuster
2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting December 2, 2010 京都 ウェステ

イン都ホテル

Kobayashi A. Understanding normal and post-surgical anatomy
The 25th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress 16 September 2010 Beijing, China, China national convention center

Mawatari Y, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Intraocular Pressure After Descemet Stripping and Non- Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty
81th Association for Reserch in Vision and Ophthalmology May 2, 2010 Fort Lauderdale convention center, USA

Yokogawa H, Kobayashi A, Sugiyama K. Clinical Outcomes With the Tan End Glide : A New Donor Inserter for DSAEK
81th Association for Reserch in Vision and Ophthalmology May 2, 2010 Fort Lauderdale convention center, USA

Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Clinical Results with the Neusidle Corneal Inserter (New Donor Inserter for DSAEK) for Small Asian Eyes
81th Association for Reserch in Vision and Ophthalmology May 2, 2010 Fort Lauderdale convention center, USA

Masaki T, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Clinical results of non Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. World Ophthalmology Congress
World ophthalmology congress 2010 June 5, 2010 International Congress Centrum Berlin Germany

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
第7回宮城先進医療研究会 2010年6月30日 東北大学 宮城県

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
第9回北海道角膜セミナー 2010年8月7日 ホテルニューオータニ札幌 北海道

小林 顕 DSAEKにおける危機管理と解決法
第1回静岡角膜クラブ 2010年10月2日 グランドホテル中島屋 静岡県

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
第91回富山大学眼科臨床カンファレンス 2011年1月15日 富山国際会議場 富山県

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
第13回眼科サージャンの会 2011年2月25日 前橋マーキュリーホテル群馬県

小林 顕 角膜内皮移植
第1回 林眼科オープン手術カンファレンス 2011年3月5日 林眼科 福岡県

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
第142回宮崎県眼科医会講習会 2011年4月16日 ホテルJALシティ宮崎、宮崎県

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
第9回新潟眼科手術研究会 2011年9月3日 新潟グランドホテル、新潟市

小林 顕 角膜内皮移植術 (DSAEK) の臨床と最近の話題
2012年12月08日 播州オキュラーサーフェイス講演会 姫路市 イーグレ姫路

〔図書〕 (計1件)

小林 顕 角膜内皮移植術 眼科マイクロサージェリー第6版 III角膜・結膜手術2010, 237-249 エルゼビアジャパン 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林顕 (KOBAYASHI AKIRA)

金沢大学・医学系・助教授

研究者番号 : 20303274