

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11261

研究課題名(和文) 新しい角膜内皮移植(DMEK/DMAEK/PDEK)の確立とドナー接着機構の解明

研究課題名(英文) Development of new keratoplasty technique-DMEK/DMAEK/PDEK-

研究代表者

小林 顕(KOBAYASHI, AKIRA)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：20303274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、DSAEK/DMEKにおける新しい挿入器具の開発に成功し、アシコ社から販売を開始した。本器具を使用することにより、DMEK手術時間が有意に短縮し、更に角膜内皮細胞に対する障害性が従来法よりも少なく、内皮細胞温存率が高いことが判明した。また、DMEKにおける上皮を温存する有用性について、OCTと共焦点顕微鏡を用いた新たな研究を開始した。具体的には、術中に角膜上皮を温存したほうが、術後の角膜厚が正常に近く、更に角膜神経が温存されるデータが蓄積されつつある。更に、confocal microscopyを用いた角膜内皮移植後のデータは順調にそろいつつあり解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの結果から考えられる意義は以下の通りである。(1)DMEK/DMAEK/PDEKにおいては、DSAEKに比較して良好な視力が得られるが、それらは、上皮下混濁、層間混濁、層間沈着物などが少ないことが関与している可能性が推測された。また、術後視機能と層間混濁の関連性が明らかになった。これらの結果は、どの角膜内皮移植が最適な術式であるかを定める参考となる。(2)DMEK/DMAEK/PDEK専用器具が開発されたことにより、より安全な術式となり、日本国内のみならず、アジアを含めた世界的に普及が期待される。

研究成果の概要(英文)：We established novel surgical device and techniques concerning DSAEK and DMEK. The device has become available from ASICO company. By using this device, the surgical time shortened with less endothelial cell damages. We further study the importance of corneal epithelial cells during DMEK surgery using OCT and confocal microscopy.

研究分野：眼科

キーワード：角膜移植 DSAEK DMEK confocal microscopy 光干渉断層計

## 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、縫合系に関連した感染症、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世界的に行われている。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 μm 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無縫合角膜移植手術である。

DSAEK においては以下に示すような多くのメリットが認められる。角膜上が無縫合であり、縫合系感染や縫合系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、平均 0.7 程度の矯正視力が得られる。

研究代表者はこれまでに、DSAEK の際にはホストのデスメ膜の剥離除去を行わない新しい角膜内皮移植術を開発し、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 (Am J Ophthalmol 2008;146:543-554, Ophthalmology 2009;116:1306-1313.)

最近、デスメ膜と内皮細胞のみを移植する究極の角膜内皮移植術である DMEK (Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty) が提唱され、欧米において採用する術者が増えている。研究代表者はアジアで初めて DMEK を成功させ (2011 年) 術後平均視力 = 1.23 という驚異的な術後成績を得た。さらに、ドナーレシピエント層間の混濁が、DMEK 後には DSAEK に比較して有意に少ないことを見出し、DMEK 術後の視力の良さと相関している可能性を報告した。ただし、この素晴らしい手術の難易度は極めて高く、一般眼科医が行うには、更なる技術革新と専用器具の開発が必要である。また、術後角膜の生体組織学的な解析や接着機構の解明はまだ行われていない。近年、DMEK の術後視力の良好さを維持しつつ、手術の難易度を下げるために、DMAEK という術式が提唱された。DMAEK では、DMEK ドナーの周辺部にわずかな角膜実質が付着しているため、ドナーの挿入には DSAEK と同様の手技を使用でき、比較的難易度は低い。われわれは、既にアジアにおいて初めて DMAEK を成功させた経験がある。さらに近年、角膜実質後部に Dua 層という新しい層構造が確認され、Dua 層と内皮層を移植する PDEK という術式も開発された。

我々の研究グループでは、角膜の生体画像解析を得意としており、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初めて報告した (Am J Ophthalmol 2008;145(6):977-985.)。さらに、近年、解像度が優れた前眼部光干渉断層計 (前眼部 OCT) が開発され、生体角膜の断面図の詳細な解析が可能となった。また、術中にリアルタイムで OCT 所見を観察できる OCT 手術顕微鏡 (RESCAN700, Zeiss) が開発され、術中のドナーホストの接着状態がリアルタイムで観察可能となった。

これらの臨床実験結果とこれまでの多数の臨床経験、あるいは最新の解析装置の発展から、最新の術式である DMEK/DMAEK/PDEK の術中・術後の視機能への影響や DSAEK と比較した優位性、DSAEK と比較した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、本研究を着想する動機となった。

## 2. 研究の目的

- ( I ) 本研究では、レーザー共焦点顕微鏡と前眼部 OCT、OCT 手術顕微鏡を用いて DMEK/DMAEK/PDEK 後角膜の 2 次元ならびに 3 次元構造を明らかにし、DSAEK との違いを探索する。
- ( ) 更に DMEK/DMAEK/PDEK 後の他覚的視機能 (視力、コントラスト感度、高次収差など) の解析を行い、自覚的な術後視機能の質についても、従来の全層角膜移植術、DSAEK などと比較検討を行う。
- ( ) 米国アシコ社との協力により、DMEK/DMAEK/PDEK 専用器具の開発を行う。

## 3. 研究の方法

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

対象はそれぞれ 10 人の DSAEK 後患者、DMEK 後患者、DMAEK 後患者、PDEK 後患者、を予定している。レーザー共焦点顕微鏡を用いて、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ニングを行う。得られた多数の 2 次元画像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、広範囲モンタージュを作成する。

更に広範囲モンタージュ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、異なる日に最低 2 回は実験を行う。

#### 計画 2. DMEK/DMAEK/PDEK 術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 10 人の DSAEK 後患者、DMEK 後患者、DMAEK 後患者、PDEK 後患者を予定している。レーザー共焦点顕微鏡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  $\mu\text{m}$  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う。また、前眼部光干渉断層計を用いた DMEK 後角膜の断層像の解析も行う。

#### 計画 3. DMEK/DMAEK/PDEK 専用器具の作成

現在、DMEK ドナー把持セッシーや DMEK の際の前房内空気注入カニューラの試作を行っている。平成 28 年度には、この器具を作成し、さらに、DMEK ドナー作成器具と、DMEK ドナーの操作器具の開発を予定している。

#### 計画 4. レーザー共焦点顕微鏡を用いたウサギ DMEK 後角膜の 2 次元・3 次元構造の解析

20 匹と白色ウサギ (生後 24 週) を使用する。ペントバルビタールの腹腔内投与 (65mg/kg) にて麻酔し、実験助手の介助のもと、ウサギに対して DSAEK/DMEK/DMAEK/PDEK を施行する。これらのウサギについて、レーザー共焦点顕微鏡を使用し、2 次元・3 次元構造の解析を行う。(計画 1・計画 2 と同様の方法) 具体的には、角膜中央の生体観察を角膜上皮、実質、ホスト - ドナー層間、ドナーデスメ膜、ドナー内皮の各レベルにおいて広範囲に行う。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、広範囲モンタージュを作成する。得られた広範囲モンタージュ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して、ヒトでのデータと比較検討を行う。

### 4. 研究成果

研究期間中に DSAEK/DMEK/PDEK における新しい挿入器具の開発に成功し、アシコ社から世界において販売を開始した。その器具を使用した実際の DSAEK/DMEK の臨床結果を角膜カンファランス 2018 (広島) において発表した。本器具を使用することにより、DMEK 手術時間が有意に短縮し、更に角膜内皮細胞に対する障害性が従来法よりも少なく、内皮細胞温存率が高いことが判明した。これらの新しい知見を、2019 年の日本臨床眼科学会総会や米国の最大の臨床眼科学会 (American Academy of Ophthalmology Meeting) において発表を行った。また、これらの結果を Case Report of Ophthalmology 誌に投稿し掲載された。

DMEK における上皮を温存する有用性に研究に気がつき、それについても OCT と共焦点顕微鏡を用いた新たな研究を開始した。具体的には、術中に角膜上皮を温存したほうが、術後の角膜厚が正常に近く、更に角膜神経が温存されるデータが蓄積されつつある。これらのデータは現在角膜専門雑誌である CORNEA に既に投稿中である。

confocal microscopy を用いた角膜内皮移植後のデータは順調にそろいつつあり、現在、ソフトウェアを用いてデータを解析中である。また、DSAEK/DMEK/DMAEK 後の視機能 (術後視力、角膜内皮細胞密度、コントラスト感度測定、高次収差) の解析にも着手している。DSAEK/DMEK と硝子体手術を同時に行う新しい手術手技を開発し、Cornea 誌に報告した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Inoda S, Hayashi T, Takahashi H, Oyakawa I, Yokogawa H, Kobayashi A, Kato N, Kawashima H. Risk factors for Cystoid Macular Edema After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2019 Apr 9. (doi:10.1097/ICO.0000000000001950) (査読有り)
2. Nishino T, Kobayashi A, Mori N, Masaki T, Yokogawa H, Fujiki K, Yanagawa A, Murakami A, Sugiyama K. In vivo histology and p.L132V mutation in KRT12 gene in Japanese patients with Meesmann corneal dystrophy. *Jpn J Ophthalmol*. 2019 Jan;63(1):46-55. (doi: 10.1007/s10384-018-00643-6) (査読有り)
3. Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Masaki T, Sugiyama K. Development of a Donor Tissue Holding Technique for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty Using a 25- Gauge Graft Manipulator. *Case Rep Ophthalmol*. 2018 Oct 11;9(3):431-438. (doi: 10.1159/000493571) (査読有り)
4. Yokogawa H, Kobayashi A, Okuda T, Mori N, Masaki T, Sugiyama K. Combined Keratoplasty, Pars Plana Vitrectomy, and Flanged Intraclear Intraocular Lens Fixation to Restore Vision in Complex Eyes With Coexisting Anterior and Posterior Segment Problems. *Cornea*. 2018 Nov;37 Suppl 1:S78-S85. (doi:10.1097/ICO.0000000000001716) (査読有り)
5. Nishino T, Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Masaki T, Sugiyama K. A 10-year review of underlying diseases for endothelial keratoplasty (DSAEK/DMEK) in a tertiary referral hospital in Japan. *Clin Ophthalmol*. 2018 Aug 6;12:1359- 1365. (doi: 10.2147/OPHTH.S170263) (査読有り)
6. Nishino T, Kobayashi A, Mori N, Masaki T, Yokogawa H, Sugiyama K. Clinical evaluation of a novel surgical technique (large cross incision) for conjunctival cysts. *Can J Ophthalmol*. 2018 Feb;53(1):e36-e39. (doi: 10.1016/j.jcjo.2017.06.013) (査読有り)

〔学会発表〕(計 41 件)

1. 角膜移植手術の選択と適応 小林 顕 第 70 回日本臨床眼科学会 2016 年 11 月 4 日 京都府国立京都国際会館
2. DSAEK or DMEK 小林 顕 第 70 回日本臨床眼科学会 2016 年 11 月 5 日 京都府国立京都国際会館
3. 角膜内皮移植術：最新の話 小林 顕 第 17 回有明眼科懇話会 2016 年 3 月 19 日 久留米ビジネスプラザ 久留米市
4. DSAEK 小林 顕 第 1 回 3Q の会 2016 年 8 月 5 日 リーガロイヤルホテル小倉 北九州市
5. ここまで来た！角膜内皮移植 小林 顕 第 20 回 Cornea Update seminar 2016 年 11 月 12 日 大手町サンケイプラザ 東京
6. 角膜手術の最先端 眼科臨床実践講座 2016 小林 顕 2016 年 7 月 18 日 東京都（ベルマーレ日本橋）
7. 第 94 回岡山大学眼科研究会 小林 顕 角膜内皮移植：DSAEK と DMEK の使い分け 2016 年 8 月 27 日 グランピア岡山 岡山市
8. 角膜内皮移植術（nDSAEK）術後の長期臨床成績 正木利憲、小林 顕、横川英明、森奈津子、杉山和久 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡市（アクロス福岡）
9. アルゴンレーザー虹彩切開術後水疱性角膜炎に対する DSAEK 術後の内皮細胞密度 森奈津子、小林 顕、横川英明、杉山和久 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡市（アクロス福岡）
10. 角膜移植（PK/DSAEK）における経結膜 IOL 強膜内固定の同時手術 横川英明、小林 顕、奥田徹彦、森奈津子、正木利憲、杉山和久 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡市（アクロス福岡）
11. OCT 手術顕微鏡 RESCAN700 の DMEK における有用性 小林 顕、横川英明、森奈津子、杉山和久 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡市（アクロス福岡）
12. nDSAEK 術後の移植片接着不良が自然回復した 1 例 高橋彩、福田昌彦、西田功一、杉岡孝二、小林 顕、下村嘉一 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡市（アクロス福岡）
13. 結膜嚢胞に対する結膜十字切開術の有用性 西野翼、小林 顕、森奈津子、正木利憲、横川英明、杉山和久 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡市（アクロス福岡）
14. アルゴンレーザー虹彩切開術後水疱性角膜炎に対する DMEK の初期臨床成績 小林 顕、横川英明、森奈津子、正木利憲、杉山和久 第 121 回日本眼科学会総会 2017 年 4 月 7 日 東京都（東京国際フォーラム）
15. 濾過眼症例における角膜内皮移植術（nDSAEK）の長期臨床成績 正木利憲、小林 顕、横川英明、森奈津子、杉山和久 第 121 回日本眼科学会総会 2017 年 4 月 7 日 東京都（東京国際フォーラム）
16. 濾過眼症例における角膜内皮移植術（nDSAEK）の長期臨床成績 川口一朗、小林 顕、東出朋巳、竹治康広、櫻井一志、川口千晶、杉山和久 第 121 回日本眼科学会総会

2017年4月7日 東京都(東京国際フォーラム)

17. In vivo confocal microscopy of the postsurgical cornea Kobayashi A. The 32<sup>nd</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, March 3rd, 2017, Singapore. (Suntec Singapore Convention & Exhibition center)
18. 角膜内皮移植を極める DSAEK と DMEK の使い分け 小林 顕  
第40回日本眼科手術学会総会 2017年1月27日 東京都(東京国際フォーラム)
19. 角結膜疾患の治療におけるワンポイントアドバイス 小林顕 2017年8月20日  
第5回Tokai Ophthalmic Academy 名古屋市(名鉄ニューグランドホテル)
22. 角結膜疾患の治療におけるワンポイントアドバイス 小林顕 2017年9月9日  
第22回越後眼科研究会新潟市(ホテルオークラ新潟)
21. 角膜内皮移植術 DMEK 小林顕 2017年10月21日 第56回大阪眼科手術の会  
大阪市(ホテルグランピア大阪)
22. Genetic analysis and in vivo histology of Meesmann epithelial corneal dystrophy. Nishino T, Kobayashi A., Mori N, Masaki T, Yokogawa H, Fujiki K, Yanagawa A, Murakami A, Sugiyama K. Association for Reserch in Vision and Ophthalmology 2018, May 1, in Honolulu, Hawaii (Hawaii Convention Center) (U.S.A.)
23. De novo iris abnormality after Descemet membrane endothelial keratoplasty and its impact on postoperative clinical outcomes. Yokogawa H, Kobayashi A., Mori N, Nishino T, Masaki T, Sugiyama K. Association for Reserch in Vision and Ophthalmology 2018, April 30, in Honolulu, Hawaii (Hawaii Convention Center) (U.S.A.)
24. A 10-year review of underlying diseases for endothelial keratoplasty (DSAEK/DMEK) in a tertiary referral hospital in Japan. Kobayashi A., Nishino T, Yokogawa H, Mori N, Masaki T, Sugiyama K. Association for Reserch in Vision and Ophthalmology 2018, May 3, in Honolulu, Hawaii (Hawaii Convention Center)(U.S.A.)
25. Intraoperative OCT (iOCT) using RESCAN700 for DSAEK/DMEK Kobayashi A. The 33rd Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Feb 9, 2018, Hong Kong. (Hong Kong Convention & Exhibition Centre)
26. Graft management during DMEK using novel graft manipulator. Kobayashi A. The 6th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting (ACS 2018), May 17, 2018 Qingdao, China (Shangri La Hotel Qingdao)
27. Surgical correction of astigmatism during DSAEK for failed penetrating keratoplasty. Kobayashi A. The 6th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting (ACS 2018), May 17, 2018 Qingdao, China (Shangri La Hotel Qingdao)
28. Update of endothelial keratoplasty in Japan Kobayashi A. The 11th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists, Dec 6, 2018, Fukuoka, Japan. (Centennial Hall)
29. 短時間で再現性良く行うことが出来る DMEK 術式(デスメ膜把持法)の開発 小林 顕、横川英明、森奈津子、正木利憲、杉山和久 角膜カンファランス 2018 2018年2月16日  
広島市(グランドプリンスホテル広島)
30. 過去の全層角膜移植眼に対する DSAEK における乱視矯正角膜追加縫合の効果 正木利憲、小林 顕、横川英明、森奈津子、杉山和久 角膜カンファランス 2018 2018年2月16日  
広島市(グランドプリンスホテル広島)
31. DSAEK 術後内皮機能不全眼に対する再 DSAEK 横川英明、小林 顕、森奈津子、西野翼、正木利憲、杉山和久 角膜カンファランス 2018 2018年2月16日  
広島市(グランドプリンスホテル広島)
32. 白内障サーજャンのための角膜内皮レスキュー講座 親川格、加藤直子、小林 顕、佐竹良之、花林孝彦 第33回日本白内障屈折矯正手術学会総会 2018年7月1日  
東京都(東京国際フォーラム)
33. 角膜内皮移植術(DSAEK/DMEK)ビデオカンファランス:合併症の克服 小林顕、天野史郎、稲富勉、川北哲也、林孝彦、西田幸二、門田遊 第72回日本臨床眼科学会  
2018年10月12日 東京都 東京国際フォーラム
34. 金沢大学における15年間の角膜移植術式と原疾患の推移 西野 翼、小林 顕、横川 英明、正木 利憲、森 奈津子、杉山和久 第72回日本臨床眼科学会 2018年10月11日 東京都  
東京国際フォーラム
35. 角膜移植後の眼圧下降戦略 小林 顕 第41回日本眼科手術学会総会 2018年1月28日  
京都 国立京都国際会館
36. 角膜内皮移植の最前線 小林 顕 第41回日本眼科手術学会総会 2018年1月28日  
京都 国立京都国際会館
37. 角結膜疾患の治療におけるワンポイントアドバイス 小林 顕 2018年4月26日  
第4回Yokohama Ocular Surface Meeting 横浜市(横浜ベイホテル東急)
38. 角結膜疾患の治療におけるワンポイントアドバイス 小林 顕 2018年6月22日  
第12回埼玉角結膜の会 川越市
39. 角結膜手術における最近の試み 小林顕 2018年7月7日  
第7回関西角膜セミナー大阪市(ヒルトン大阪)

40. 角結膜疾患の治療におけるワンポイントアドバイス 小林 顕 2018 年 9 月 29 日  
岐阜県眼科医会東濃眼科研究会 岐阜県多治見市
41. 角結膜疾患の治療におけるワンポイントアドバイス 小林 顕 2018 年 10 月 17 日  
第 4 回アルコン学術講演会 神奈川県横浜市 ベイシェラトン横浜

〔図書〕(計 0 件)

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。