

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791982

研究課題名(和文)フェムトセカンドレーザーを用いた無縫合角膜移植の開発

研究課題名(英文)Development of sutureless keratoplasty using femtosecond laser

研究代表者

相馬 剛至(Soma, Takeshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：70582401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：実験用家兎においてフェムトセカンドレーザーを用いた無縫合角膜移植の開発を行った。水疱性角膜症モデルならびにドナー角膜に対し、ジグザグ型、トップハット型、マッシュルーム型の角膜切開を行った結果、いずれの組織にも炎症細胞の浸潤を認めず、本レーザーにより侵襲の少ないレシピエント角膜の切開ならびにドナー角膜の作製が可能であった。作製したドナー角膜は、従来の全層角膜移植と同等もしくは少ない縫合数で移植することが可能であった。スクリュー型の切開法が確立されれば無縫合角膜移植の実現につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated sutureless penetrating keratoplasty (PK) using femtosecond laser (FSL) in rabbit. No inflammatory cell was observed in corneal tissues after zig-zag, top-hat, and mushroom incision using FSL both in normal and bullous keratopathy model rabbit. Each donor was transplanted to recipient donors with fewer sutures compared to conventional PK. Screw configuration using FSL might be useful for sutureless PK.

研究分野：医歯薬学

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 フェムトセカンドレーザー

1. 研究開始当初の背景

角膜疾患は、全世界で白内障に次いで失明原因の第2位に挙げられる疾病である。その中心的な治療法は、ドナーから提供された正常な角膜を移植する角膜移植である。我が国で行われている角膜移植のうち、最多の原因疾患は水疱性角膜症である。水疱性角膜症は角膜の最内層に位置する内皮細胞に非代償的な障害が生じることにより、ポンプ機能が働かず、角膜実質に浮腫が生じ著しく視力障害をきたす。角膜内皮細胞は生体では増殖しないため、失われた内皮機能を回復するためには角膜全体を移植する全層角膜移植以外に治療方法はない。現在行われている全層角膜移植では、病的な宿主角膜を切開して除去した後に、提供された眼球から作製したドナー角膜を縫合し移植するが、宿主、ドナーいずれの切開もマニュアルで行うため、厳密に言えば切開層が一致せずドナー・宿主角膜間にずれが生じる。また、宿主、ドナーともに円柱状に垂直切開するため、ドナー角膜の強度を保持するために縫合を十分に行う必要があり、術後に不正乱視が生じ視力の回復には限界がある。加えて、縫合糸の抜糸に伴い角膜形状が変化し、屈折度数や乱視が変化することも Quality of Vision (視覚の質) を低下させる原因となっている。さらに、縫合糸は角膜移植において術後に感染症を引き起こす原因となっている。角膜移植では、拒絶反応予防を目的として、術後に副腎皮質ステロイド薬を用いるため眼表面が易感染性の状態になっており、感染症の予防は角膜移植の成績向上のために克服すべき課題である。

これに対し、近年、フェムトセカンドレーザーを用いた新しい角膜移植法が報告されている。フェムトセカンドレーザーは波長が1030nm~1060nmの赤外線レーザーで、約10 μ mのバブルを10⁻¹⁵秒という短時間で発生させることにより、組織を3次的に正確精密に切開することを可能にした。眼科領域では屈折矯正手術における角膜フラップの作製を目的として開発されたが、最近、この技術が角膜移植における角膜切開に応用されている。具体的には、あらかじめプログラミングされたコンピューター制御による3D照射により、宿主角膜とドナー角膜を完全に同型に切除する。加えて、トップハット型やマッシュルーム型、ジグザグ型の切開を行うことにより、鑄型のごとくドナー角膜を嵌め込むことができ、従来の垂直切開と比較して、角膜縫合数を少なくすることが可能である (Hoffart L, et al. Am J Ophthalmol. 2008, Holzer MP, et al. Am J Ophthalmol, Steinert RF, et al. Am J Ophthalmol. 2007)。

しかし、これらの方法においても、宿主-グラフト間の離開を防ぐため、最低限の縫合が必要であり、臨床上問題となる縫合糸に伴う不正乱視や感染症の問題は残る。加えて、臨床応用に際し、研究用アインバンク角膜を

用いて切開法のシミュレートを行っているが、生体すなわちモデル動物を用いた検討がほとんど行われておらず、術後のホスト-グラフト間の創傷治癒や免疫反応についての組織学的検討がなされていないことが問題と考える。

2. 研究の目的

本研究では上記の問題点を克服すべく、フェムトセカンドレーザーを用いた無縫合全層角膜移植の開発を目的とする。実験用家兎を用いて、フェムトセカンドレーザーによるスクリュウ型に角膜切開を施した角膜移植術の開発を行う。スクリュウ型に角膜を切開することによりドナー角膜が雄ネジ、宿主角膜が雌ネジのごとく振る舞い、無縫合の角膜移植が可能になると考える。また、スクリュウ型切開による角膜移植を家兎・水疱性角膜症モデルに施行し、組織学的検討ならびに角膜厚測定を行う。これにより創傷治癒や免疫反応を組織学的に検討するとともに治療効果に関する知見を得ることができる。

3. 研究の方法

フェムトセカンドレーザーを用いて家兎角膜の切開を行うにあたり、ヒト臨床で行われている方法(ジグザグ型、トップハット型、マッシュルーム型)の家兎における最適な条件を検討する。

次に、フェムトセカンドレーザーを用いて角膜を切開した場合に惹起される炎症について検討する。正常家兎角膜をフェムトセカンドレーザーで切開し、ドナー移植片を作製する。また、経角膜的に冷凍凝固を施行し作製した水疱性角膜症モデルに対し、同レーザーで切開しレシピエント角膜を準備する。作製したドナー角膜片およびレシピエント角膜を組織学的検討に供し、HE染色ならびに、CD3, CD4, CD8, CD11b, CD20, F4/80, Macrophage, α SMAの免疫染色を行って検討する。

スクリュウ型の角膜切開は、既存のフェムトセカンドレーザーのプログラムには搭載されていないため、新規のプログラムを構築する。フェムトセカンドレーザーのプログラミングについて、専門的な知識を有する共同研究者とスクリュウ型角膜切開のプログラムを構築する。スクリュウ型切開におけるネジ山の高さ、フランク角度などの条件について、最適な条件を決定し、市販型モデルへの導入を検討する。

家兎の疾患モデルに対する移植後の角膜厚測定を行い経過観察後の治療効果を判定する。移植後の角膜組織をHE染色ならびに、CD3, CD4, CD8, CD11b, CD20, F4/80, Macrophage, α SMAの免疫染色にて検討し術後の創傷治癒および免疫反応について評価する。

4. 研究成果

家兎では呼吸に伴う体動がフェムトセカンドレーザーによる角膜切開の正確性に影響するため、体動を完全に抑制した状態でレーザーを施行した。また、角膜厚が300um前後とヒト角膜の520umと比較して薄いことから、切開深度の最適化をおこなった。ヒト角膜と同等のレーザー照射条件で家兎角膜を切開した結果、一部の層間で平滑な切除面が得られず、不完全な切開であった。そこで、エネルギー、照射密度、照射時間を最適化することにより、家兎角膜においてヒトと同様の平滑な角膜切開(ジグザグ型、トップハット型、マッシュルーム型)を得ることができた。

フェムトセカンドレーザーを用いて切開した正常家兎角膜では、ドナー角膜片、レシピエント角膜ともに検眼鏡的観察において明らかな角膜混濁等の所見は認めず、透明性は保持されていた。また、水疱性角膜症モデル家兎角膜においても、レーザー施行により明らかな検眼鏡的な変化は認めなかった。また、HE染色による組織学的検討においても正常眼では細胞浸潤を認めず、水疱性角膜症眼ではレーザー施行前と比較して同等であった。加えてCD3, CD4, CD8, CD11b, CD20, F4/80, Macrophage, αSMAの免疫染色を施行したところ、正常角膜においてはいずれのマーカーの発現も認めず、水疱性角膜症眼でも施行前と差はなかった。本研究ではヒト角膜と比較して高エネルギーの条件でフェムトセカンドレーザーによる家兎角膜の切開を行ったが、本レーザーが惹起する炎症がないことが確認された。

スクリー型 of 角膜切開におけるネジ山の高さやフランク角度といった条件の検討を行った。現在はプログラムを組み込む検討を行っている段階である。本研究では従来の切開方法(ジグザグ型、トップハット型、マッシュルーム型)を行い、最低限の縫合でモデル角膜への移植を行った。術後、いずれの方法においても術後に角膜厚が薄くなり、治療効果が確認された。また、術後の炎症反応についてもHE染色ならびにCD3, CD4, CD8, CD11b, CD20, F4/80, Macrophage, αSMAの免疫染色にて確認した結果、ブレードを用いてマニュアルで切開した通常の角膜移植と同等であることがわかった。

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 5 件)

<英文原著>

1. Development of a Cell Sheet Transportation Technique for Regenerative Medicine. Oie Y, Nozaki T, Takayanagi H, Hara S, Hayashi R, Takeda S, Mori K, Moriya N, Soma T, Tsujikawa M, Saito K, Nishida K. Tissue Eng Part C Methods.

Nov 26, 2013. (査読あり)

2. Effect of Instillation of Dry Eye Drops on Optical Quality. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Takai Y, Fujimoto H, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Nishida K. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 27, 2013. (査読あり)

3. Interface fluid syndrome after laser in situ keratomileusis following herpetic keratouveitis. Goto S, Koh S, Toda R, Soma T, Matsushita K, Maeda N, Nishida K. J Cataract Refract Surg. 39:1267-1270, 2013. (査読あり)

4. Development of methicillin-resistant Staphylococcus aureus keratitis in a dry eye patient with a therapeutic contact lens. Koh S, Maeda N, Soma T, Hori Y, Tsujikawa M, Watanabe H, Nishida K. Eye Contact Lens. 38:200-202, 2012. (査読あり)
<和文原著>

5. 中川智哉, 前田直之, 東浦律子, 相馬剛至, 高静花, 辻川元一, 大鳥安正, 西田幸二: 円錐角膜における光干渉断層計トポグラフィによる角膜形状解析と装用コンタクトレンズベースカーブとの関係 日本コンタクトレンズ学会誌:54, 159-164, 2012. (査読あり)

[学会発表](計 30 件)

<国際学会>

1. Soma T: Symposium: Bioengineered Stroma Using a New Biocompatible Cross Linker. TERMIS-AP 2013, Shanghai, Wuzhen, China. 2013.10.22-27

2. Soma T, Matsusaki M, Ajiro H, Tsujikawa M, Hayashi R, Oie Y, Akashi M, Nishida K: Efficacy of a novel bioengineered corneal stroma fabricated by a new biocompatible cross linker in corneal stromal disease model. ARVO 2013, Seattle, the United States of America, 2013.5.5-9

3. Soma T: Symposium: Bioengineered Stroma Using a New Biocompatible Cross Linker. 28th Asia Pacific Academy of Ophthalmology, Hyderabad, India, 2013.1.16-20

4. Soma T: Symposium: Retention and distribution of epithelial stem and progenitor cells following corneal reconstruction with oral mucosal cell sheets. 28th Asia Pacific Academy of Ophthalmology, Hyderabad, India, 2013.1.16-20

5. Soma T: Symposium: Bioengineered Stroma Using a New Biocompatible Cross Linker. 3rd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, Manila, Philippines, 2012.10.27-29

6. Soma T: Symposium: New ocular therapeutic regimens: Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface

Reconstruction. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Busan, Korea, 2012.4.13-16

7. Soma T: Symposium: Challenging Cases symposium for the Cataract subspecialty; Cataract Surgery in Patients with Severe Corneal Opacity. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Busan, Korea, 2012.4.13-16

8. Soma T: Symposium: Retention and distribution of epithelial stem/progenitor cells following corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets using oral mucosal epithelial cells. Tianjin International Ophthalmology Forum 2011, Tianjin, China, 2011. 8. 27.

9. Soma T: Symposium: Retention and Distribution of Epithelial Stem/Progenitor Cells following Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets using Oral Mucosal Epithelial Cells. Osaka University/ The Chinese University of Hong Kong Ophthalmology Forum 2011, Osaka 2011.8.4

10. Soma T: Symposium: Histological evaluation of mechanical epithelial separation in epi-LASIK; Possibility of an alternative procedure to LASIK. The Sino-Japanese Ocular Surface Disease Research Collaboration Joint Meeting, Xiamen, China, 2011. 1. 15

<国内学会>

11. 相馬剛至: 生体適合性架橋剤を用いた角膜実質疾患治療の開発. 第5回UAC霧島眼科研鑽会、都城、2014年2月14日

12. 相馬剛至、松崎典弥、松本匡広、辻川元一、林竜平、大家義則、網代広治、明石満、西田幸二: 生体適合性架橋剤とフェムト秒レーザーを用いた菲薄化角膜に対する角膜実質再生治療. 角膜カンファランス 2014、宜野湾、2014年1月30日~2月1日

13. 相馬剛至: 教育セミナー・角膜全層移植の基本手技「術後管理」. 第37回日本眼科手術学会総会、京都、2014年1月17日~19日

14. 相馬剛至、藤本久貴、大家義則、中尾武史、高静花、辻川元一、川崎諭、前田直之、西田幸二: 新規に開発したグラフトインサーターを用いた角膜内皮移植の短期成績. 第67回臨床眼科学会、横浜、2013年10月31日~11月3日

15. 相馬剛至: 自己免疫に関連した角膜疾患-Mooren潰瘍、サイトメガロウイルス角膜内皮炎. 第9回武庫川眼科アカデミー、武庫川、2013年10月4日

16. 相馬剛至、西田幸二: 角膜移植アップデート. 第235回OCC、大阪、2013年10月12日

17. 相馬剛至、松崎典弥、松本匡広、辻川元

一、林竜平、大家義則、網代広治、明石満、西田幸二: 生体適合性架橋剤とフェムト秒レーザーを用いた新規の角膜実質再生治療法. 日本バイオマテリアル学会 第8回関西若手研究発表会、大阪、2013年8月31日

18. 相馬剛至: フェムト秒レーザーの眼科領域への応用. GKK、大阪、2013年7月28日

19. 相馬剛至、渡辺真矢、洲崎朝樹、藤本久貴、大家義則、高静花、辻川元一、前田直之、西田幸二: 前眼部光干渉断層計を用いた治療用コンタクトレンズ眼におけるsag値と脱落の関係. 第56回日本コンタクトレンズ学会、大阪 2013年7月13日~14日

20. 相馬剛至: 眼の再生医療. 伊丹市医師会学術講演会、伊丹 2013年6月6日

21. 相馬剛至: 自己免疫に基づく角膜およびその関連疾患の最前線. Mooren潰瘍. 第117回日本眼科学会総会、東京 2013年4月4日~7日

22. 相馬剛至: 生体適合性架橋剤とアテロコラーゲンを用いた角膜実質の再生. 角膜カンファランス 2013、和歌山 2013年2月14日~16日

23. 相馬剛至、藤本久貴、大家義則、高静花、辻川元一、前田直之、西田幸二: 新規に開発したグラフトインサーターを用いた角膜内皮移植の2症例. 角膜カンファランス 2013、和歌山 2013年2月14日~16日

24. 相馬剛至: 教育セミナー・角膜移植の基本手技「早期・晩期合併症」. 第36回日本眼科手術学会総会、博多、2013年1月25日~27日

25. 相馬剛至、三浦聡子、大家義則、中尾武史、高静花、辻川元一、前田直之、西田幸二: 角膜移植後における角膜上皮厚と角膜知覚についての検討. 第66回日本臨床眼科学会総会、京都、2012年10月25日~28日

26. 相馬剛至、松崎典弥、網代広治、辻川元一、林竜平、大家義則、明石満、西田幸二: 生体適合性架橋剤を用いた角膜実質再生治療法の開発. 第11回日本再生医療学会総会、横浜、2012年6月12日~14日

27. 相馬剛至、松崎典弥、網代広治、辻川元一、林竜平、大家義則、明石満、西田幸二: フェムト秒レーザーと生体適合性架橋剤を用いた角膜実質再生治療法の開発. 第116回日本眼科学会総会、東京、2012年4月5日~8日

28. 相馬剛至、松崎典弥、網代広治、田中祐二、久保田享、明石満、西田幸二: コラーゲン選択的な生体適合性架橋剤とアテロコラーゲンによる人工角膜実質の開発. 角膜カンファランス 2012、東京、2012年2月23日~25日

29. 相馬剛至、大家義則、中尾武史、高静花、辻川元一、前田直之、西田幸二: 角膜内皮移植術(DSAEK)における新しい内皮グラフト挿入器の開発. 第65回日本臨床眼科学会、

東京、2011年10月9日

30. 相馬剛至、辻川元一、林竜平、林田康隆、景山智文、原進、中尾武史、高静花、前田直之、西田幸二：TACSTD2の全身における発現および角膜における局在．第115回日本眼科学会総会、東京 2011年5月12日

〔図書〕(計 12 件)

<和文著書>

1. 相馬剛至：角膜内皮移植 / DSAEK 用ドナーインジェクターについて教えてください 専門医のための眼科診療クオリファイ 12 角膜内皮障害 to the Rescue 256-257, 2012

2. 相馬剛至：中央部の浮腫 専門医のための眼科診療クオリファイ 12 角膜内皮障害 to the Rescue 13-15, 2012

3. 相馬剛至、西田幸二：Stevens-Johnson 症候群、多形滲出性紅斑、天疱瘡 / 眼類天疱瘡．専門医のための眼科診療クオリファイ 5 全身疾患と眼 190-194, 2010.

<和文総説>

4. 相馬剛至：Diagnostics スリットランプ上達講座 スリットランプによる前眼部疾患の見方(解説) 眼科グラフィック 2(2), 130-132, 2013

5. 相馬剛至：【眼科生体染色のアップデート】前眼部編 角膜疾患の生体染色 あたらしい眼科 29(12), 1593-1598, 2012.

6. 相馬剛至：【円錐角膜の新たな治療】深層層状角膜移植 眼科手術 25(4), 502-506, 2012

7. 相馬剛至、西田幸二：角膜内皮移植 (D S A E K) D S A E K のドナー挿入法 眼科手術 24(4), 401-403, 2011.

8. 相馬剛至：角膜移植 (眼球提供から移植まで) 眼科 53(12), 1709-1713, 2011.

9. 相馬剛至、西田幸二：培養上皮細胞シート移植 (眼科最新手術) -- (角結膜) 眼科 53(10), 1451-1455, 2011.

10. 相馬剛至：第 64 回臨床眼科学会学会印象記．一般口演「角結膜手術」 眼科 53:553-554, 2011.

11. 相馬剛至：学会トピックス 角膜カンファランス 2011 培養上皮細胞シート移植後の上皮幹細胞・前駆細胞の保存と分布 日眼 115:548, 2011.

12. 相馬剛至、西田幸二：海外文献紹介 上皮幹細胞を用いた角膜再生医療とその長期成績 再生医療 10:80, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

相馬剛至 (SOMA TAKESHI)

大阪大学大学院医学系研究科眼科 助教

研究者番号 : 70582401

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし