

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592007
 研究課題名（和文） ヒト角膜における新しい構造物（K-structure）の発見と臨床的意義の探求
 研究課題名（英文） Clinical significance of K-structure: a newly discovered human corneal structure
 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）：本研究では、角膜生体共焦点顕微鏡を用いて K-structure の 2 次元構造を明らかにし、それらが anterior corneal mosaic (ACM) と一致することから、K-structure が ACM の解剖学的原因であることが強く示唆された。また、ボウマン層が障害されている疾患では K-structure や ACM が消失していることが判明し、ACM はボウマン層の健全性の指標となり得ることを証明した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed 2-dimensional analysis of human corneal K-structure using in vivo laser confocal microscopy. As a result, it was proven that the K-structure and anterior corneal mosaic pattern was identical in all eyes, indicating that the K-structure is an anatomical basis of anterior mosaic formation. Furthermore, we found that both K-structure and anterior corneal mosaic disappeared in the disease where Bowman's layer is damaged, suggesting that the anterior corneal mosaic can be an indicator of health of Bowman's layer and adjacent stroma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 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：生体共焦点顕微鏡, ボウマン層, 角膜, K-structure

1. 研究開始当初の背景

ヒト角膜は透明な組織であり、比較的単純な 5 層構造（上皮、ボウマン層、実質、デスメ膜、内皮）からなると考えられている。共焦点顕微鏡を生体に直接使用して生体組織を非侵襲的に観察する試みは皮膚科領域で

行われてきたが、眼科では角膜に応用されてきた。角膜は透明であることから、共焦点顕微鏡を使用することにより 5 層構造を前額断で観察することができ、病的角膜疾患の診断や治療経過の観察に用いられるなど、臨床的に価値のある診断機器となっている。しか

し、従来の生体共焦点顕微鏡は白色光（ハロゲン光）を光源としてきたため、解像度に限界があった。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(HRTII ロストック角膜モジュール、以下 HRTII-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）や海外雑誌にも多くの報告を行ってきた。また、第30回角膜カンファレンス(平成16年2月、東京都)ではHRTII-RCMについてのランチョンセミナーを行うなど、国内では既にオピニオンリーダーとしての地位を築きつつある。また、研究代表者は本装置がヒト結膜の観察に有用であることを見出し、世界で初めて報告した。これらの研究を更に発展させるため、研究代表者は本装置を用いてヒト角膜ボウマン層付近の解剖学的特長を詳細に調べたところ、これまでに報告のない構造物を発見し、K-structure と命名した。また、この構造物が Anterior corneal mosaic の解剖学的原因ではないかとの仮説を立てた。この発見を契機として、この構造物の更に詳細な構造を、生体レーザー共焦点顕微鏡を使用して研究しようと着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、HRTII-RCM を用いて K-structure の 2 次元構造を明らかにすることが第一の目的である。また、正常角膜では、フルオレセイン染色液を滴下して上眼瞼上からマッサージを行うと、蜂の巣状(モザイク状)の模様は角膜上に出現することが知られており、anterior corneal mosaic (ACM) として知られているがその出現機序は未だに不明である。研究代表者はこれまでの研究から、K-structure が ACM を引き起こす解剖学的原因ではないかという仮説を立てた。本研究の第二の目的は、この仮説を証明するため、K-structure と ACM の関連性を調べ、臨床的に容易に観察可能な ACM がボウマン層の健全性の指標となり得るかどうかを検証することである。

3. 研究の方法

<方法 1. K-structure の 2 次元構造の解析>

対象は 30 人の正常ボランティアであり、眼疾患や全身疾患を有さず、コンタクトレンズ装用歴がないことを条件とする。HRT2-RCM を用いて、角膜中央から中間周辺部の生体観察を広範囲に行う。対象眼を塩酸オキシブ

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、角膜中央から中間周辺部にかけて Bowman 層の深さで、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 384×384 ピクセルの解像度を持ち、これは角膜上の 0.4×0.4mm 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、広範囲モンタージュを作成する。更にコンピュータプログラム (Adobe Photoshop) を用いて K-structure 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 K-structure に囲まれる多角形の面積を測定し、平均面積を算出する。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 回は実験を行う。

<方法 2. Anterior corneal mosaic と K-structure の関連性に関する研究>

対象は 30 人の正常ボランティアであり、眼疾患や全身疾患を有さず、コンタクトレンズ装用歴がないことを条件とする。フルオレセイン染色液を角膜に滴下して上眼瞼上からマッサージを行い、蜂の巣状の模様 (anterior corneal mosaic, ACM) を角膜上に出現させる。その状態を眼科用フォトスリットを用いて撮影を行う。方法 1 で得た K-structure の電子トレース像をと同一被検者における ACM の写真をコンピュータプログラム (Adobe Photoshop) を用いてスーパーインポーズして合成させ、ACM と K-structure の関連性について検討する。また、ACM の多角形の面積を測定し、平均面積を算出し、K-structure との関連性について検討する。

<方法 3. 病的角膜における K-structure の 2 次元・3 次元構造の解析>

対象は金沢大学付属病院眼科角膜外来を受診した角膜疾患の患者のうち、同意を得られた以下の角膜疾患患者である。①円錐角膜、②角膜ジストロフィ (Thiel-Behnke 角膜ジストロフィ、Reis-Bucklers 角膜ジストロフィ、Avellino 角膜ジストロフィ、顆粒状角膜ジストロフィ、斑状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィなど)、③角膜白斑、④感染・非感染性角膜炎。これらの患者において、フルオレセイン染色液を角膜に滴下して上眼瞼上からマッサージを行い、ACM を角膜上に出現させる。その状態を眼科用フォトスリットを用いて撮影を行う。その後、計画 1 と同様に、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

ヤップを接触させ、角膜中央から中間周辺部にかけてボウマン層の深さで、可能な限り広範囲にスキヤニングを行う。得られた多数のイメージを計画1と同様にPhotoshopを用いて結合し、広範囲モンタージュとK-structureの電子トレース像を作成し、2次元構造をマッピングする。また、Image-Pro Expressを用いてK-structureに囲まれる多角形の面積を測定し、平均面積を算出する。さらに、K-structureの電子トレース像を同一患者におけるACMの写真とスーパーインポーズして合成させ、ACMとK-structureの病的角膜における関連性について検討する。

4. 研究成果

20人の正常ボランティアを対象として、HRT II ロストック角膜モジュールを用いて、角膜中央から中間周辺部の生体観察を広範囲に行い、正常K-structureの2次元構造の解析を試みた。その結果、全例において角膜ボウマン層と角膜実質との境界面に網目状の広がりを持つ、線維状の構造物（直径5-15 μ m）を認めた。この構造物（K-structure）は角膜中央部と同様に、角膜周辺部においても観察された。さらに、この構造物は若年者でより明瞭に観察され、年齢とともに不明瞭になる傾向が認められた。コンピュータプログラム（Image-Pro Express; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA）を用いてK-structureに囲まれる多角形の面積を測定し、平均面積を算出した。次に、5人の正常ボランティアを対象として、フルオレセイン染色液を角膜に滴下して上眼瞼上からマッサージを行い、蜂の巣状の模様（anterior corneal mosaic, ACM）を角膜上に出現させた。その状態を眼科用フォトリットを用いて撮影を行い、同一被験者のK-structureの2次元広範囲マッピングの電子トレース像をACMの写真とスーパーインポーズして合成させ、ACMとK-structureの関連性について検討した。その結果、全例でACMとK-structureの構造が一致した。このことから、K-structureはACMの解剖学的な発生原因であることが、強く示唆された。

さらに各種角膜疾患患者を対象として、HRT II ロストック角膜モジュールを使用してK-structureの2次元構造を解析した。対象角膜疾患は①円錐角膜、②角膜ジストロフィ（Thiel-Behnke 角膜ジストロフィ、Reis-Bücklers 角膜ジストロフィ、Avellino 角膜ジストロフィ、顆粒状角膜ジストロフィ、斑状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィなど）、③角膜白斑、④感染・非感染性角膜炎などである。各対象について、K-structureを含むレベルにおいて、コンピ

Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)を用いて広範囲2次元構造を再構築し、K-structureの間隔や太さ、長さ、輝度など、各種スペックについて解析した。

その結果、全例でAnterior Corneal Mosaic (ACM)の欠損部位とK-structureの欠損部位が一致した。このことから、K-structureとACMの関連性が強く示唆された。また、K-structureは、円錐角膜の先端部やボウマン層ジストロフィ眼で特に異常を来していることから、K-structureあるいはACMはボウマン層の健全性の指標となりうることが示唆され、眼科臨床的に有用である可能性が見出された。

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 9 件）

1. In vivo laser confocal microscopy after non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty.

Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Ophthalmology (査読有り) 2009;116:1306-1313.

2. In vivo laser confocal microscopy findings and mutational analysis for Schnyder's crystalline corneal dystrophy.

Kobayashi A, Fujiki K, Murakami A, Sugiyama K.

Ophthalmology (査読有り) 2009;116:1029-1037.

3. In vivo laser confocal microscopic analysis of murine cornea and lens microstructures.

Yuasa M, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K.

Ophthalmic Surg Lasers Imaging (査読有り) 2008;39:391-396.

4. Mapping of normal corneal K-structures by in vivo laser confocal microscopy.

Yokogawa H, Kobayashi A, Sugiyama K. Cornea 2008;27:879-883. (査読有り)

5. In vivo laser confocal microscopy findings of cryopreserved and fresh human amniotic membrane.

Kobayashi A, Sugiyama K, Li W, Tseng SC. Ophthalmic Surg Lasers Imaging (査読有り) 2008;39:312-318.

6. Non-Descemet stripping automated

endothelial keratoplasty for endothelial dysfunction secondary to argon laser iridotomy.

Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Am J Ophthalmol (査読有り) 2008;146:543-549.

7. In vivo and ex vivo laser confocal microscopy findings in patients with early-stage acanthamoeba keratitis. Kobayashi A, Ishibashi Y, Oikawa Y, Yokogawa H, Sugiyama K. Cornea (査読有り) 2008;27:439-445.

8. In vivo laser confocal microscopy after descemet stripping with automated endothelial keratoplasty. Kobayashi A, Mawatari Y, Yokogawa H, Sugiyama K. Am J Ophthalmol (査読有り) 2008;145:977-985.

9. In vivo laser confocal microscopic findings of corneal stromal dystrophies. Kobayashi A, Fujiki K, Fujimaki T, Murakami A, Sugiyama K. Arch Ophthalmol (査読有り) 2007;125:1168-1173.

[学会発表] (計 4 件)

1. 小林 颯 生体共焦点顕微鏡を用いた角結膜疾患の研究(日本角膜学会学術奨励賞受賞記念講演)第 32 回角膜カンファレンス 平成 20 年 2 月 28 日～3 月 1 日 千葉県 東京ベイホテル東急

2. ボウマン層ジストロフィのレーザー生体共焦点顕微鏡所見. 小林 颯、杉山和久 第 111 回日本眼科学会総会 平成 19 年 4 月 19 日～22 日 大阪府 大阪国際会議場

3. 生体共焦点レーザー顕微鏡 (HRT2-RCM) によるマウス角膜および水晶体微細構造の生体観察. 湯浅雅史、小林 颯、横川英明、杉山和久 第 111 回日本眼科学会総会 平成 19 年 4 月 19 日～22 日 大阪府 大阪国際会議場

4. Yokogawa H, Kobayashi A, Sugiyama K. Mapping of the normal human corneal anterior collagen fiber bundles by in vivo laser scanning confocal microscopy. 78th Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 6-May 10, 2007 Fort Lauderdale, USA Convention Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 颯 (KOBAYASHI AKIRA)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20303274