

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462705

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(DMEK)の確立と、術後視機能の解析

研究課題名(英文) Establishment of DMEK for bullous keratopathy and analysis of postoperative visual function

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、最先端の角膜内皮移植である、DMEK(Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty)の術式の確立と術後視機能の解析を試みた。DMEKとは、水疱性角膜症に対する角膜内皮のみを移植する技術であり、術後視力が良く、回復が早く、拒絶反応が生じないなど様々な利点を有するが、難易度が高いのが問題である。今回の研究では、当初の予定のごとく、DMEKの際のデスメ膜を剥離する器具、微細な空気を注入する器具などを開発することが出来た。さらに、共焦点顕微鏡や前眼部光干渉断層計を用いて、DMEK術後角膜の微細な生体構造を解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this experiment, most advanced form of corneal endothelial keratoplasty, DMEK(Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty), for Japanese eye was successfully established. DMEK provides fast visual recovery with high visual acuity. Also, DMEK has almost no immunological rejection. I have also successfully developed original tools for DMEK. Additionally, I investigated in vivo postoperative microstructure of the cornea after DMEK.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮移植 DSEAK DMEK

## 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  $\mu$ 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と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 0.7 以上の矯正視力が短期間で得られている。研究代表者はアジアで初めて 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(40 か所以上)、台湾(台湾国立大学眼科など)、韓国(聖母眼科など)における DSAEK 導入指導の実績がある。また、2011 年の APAO(アジア太平洋眼科学会、オーストラリア)においては DSAEK のインストラクションコースをオーガナイズするなど、アジアにおけるオピニオンリーダーである。さらに、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。ごく最近、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、欧米のごく一部の術者の間で実験的に試みられている。研究代表者はアジアで初めて DMEK を成功させ、術後平均視力 = 1.23 という驚異的な術後成績を得た(未発表データ)。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、術後の詳細な視機能の評価や、術後角膜の組織学的な解析はまだ行われていない。

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)、海外一流眼科雑誌にも 40 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た。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、最新の術式である DMEK 術後の視機能への影響や DSAEK・nDSAEK と比較した優位性、DSAEK・nDSAEK 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、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、デスメ膜と角膜内皮細胞層のみからなる角膜内皮シートを移植する最新の角膜内皮移植術(DMEK)の術式の確立と術後視機能の評価である。本術式は技術的な難易度が極めて高いため、安定した術後成績を得るための専用器具の開発を行う予定である。さらに、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 DMEK 後角膜の超微細構造の詳細な生体解析(2次元および3次元構造)とその経時の変化の解析を行い、術後視機能との関連性を調べ、従来の手術と比較した DMEK の優位性とその科学的な根拠を探る。また、ドナー角膜内皮シート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、より安全確実な、かつ優れた術後視機能を得ることができる次世代の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 DMEK 後角膜の 2 次元構造の解析

対象はそれぞれ 20 人の DMEK 後患者、DSAEK 後患者、nDSAEK 後患者、全層移植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ンを行う。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 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 20 人の nDSAEK 後患者と DSAEK 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  $\mu$ 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 専用器具の作成

現在、ドナーの作成専用器具の試作を行っている。平成 25 年度には、この器具を作成し、さらに、DMEK ドナーの挿入器具と、DMEK ドナーの操作器具の開発を予定している。

#### 4. 研究成果

当初の計画通り、ドナー作成専用器具の作成、DMEK 専用デスメ膜剥離器具の作成、デスマクセッションなどの開発に成功した。

また、共焦点顕微鏡を用いた DMEK 術後角膜の生体超微細構造を解析し、DMEK 後にはドナーレシピエント層間にはほとんど高輝度沈着物が見られないことを見出し、DMEK 術後の抗視力との関連性が視あされた。

#### 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 14 件)

1. Mapping of dendritic lesions in

patients with herpes simplex keratitis using in vivo confocal microscopy. Yokogawa H, Kobayashi A, Mori N, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2015 Sep 24;9:1771-7. doi: 10.2147/OPHTH.S92517. (査読有り)

2. Case series and techniques of Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for severe bullous keratopathy after birth injury. Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Sugiyama K. BMC Ophthalmol. 2015 Aug 6;15:92. doi: 10.1186/s12886-015-0094-z. (査読有り)

3. Additive Intraocular Pressure-Lowering Effects of the Rho Kinase Inhibitor Ripasudil (K-115) Combined With Timolol or Latanoprost: A Report of 2 Randomized Clinical Trials. Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Suganami H, Araie M; K-115 Clinical Study Group. JAMA Ophthalmol. 2015 Jul;133(7):755-61. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.0525. (査読有り)

4. The use of endoillumination probe-assisted Descemet membrane endothelial keratoplasty for bullous keratopathy secondary to argon laser iridotomy. Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2015 Jan 8;9:91-3. (査読有り)

5. In vivo imaging of coin-shaped lesions in cytomegalovirus corneal endotheliitis by anterior segment optical coherence tomography. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Sugiyama K. Cornea. 2014 Dec;33(12):1332-5. doi: 10.1097/ICO.0000000000000269. (査読有り)

6. In vivo imaging of radial keratoneuritis in patients with Acanthamoeba keratitis by anterior-segment optical coherence tomography. Yamazaki N, Kobayashi A, Yokogawa H, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K. Ophthalmology. 2014 Nov;121(11):2153-8. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.04.043. (査読有り)

7. Surgical therapies for corneal perforations: 10 years of cases in a tertiary referral hospital.

Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2014 Oct 29;8:2165-70. doi: 10.2147/OPTH.S71102. (査読有り)

8. Endothelial keratoplasty with infant donor tissue.

Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2014 Sep 11;8:1827-30. doi: 10.2147/OPTH.S68618. (査読有り)

9. In vivo laser confocal microscopy findings of a cornea with osteogenesis imperfecta.

Kobayashi A, Higashide T, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2014 Feb 21;8:429-33. doi: 10.2147/OPTH.S58087. (査読有り)

10. In vivo laser confocal microscopy findings of radial keratoneuritis in patients with early stage Acanthamoeba keratitis. Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K. Ophthalmology. 2013 Jul;120(7):1348-53. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.12.038. (査読有り)

11. Clinical features of single and repeated globe rupture after penetrating keratoplasty. Murata N, Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2013;7:461-5. doi: 10.2147/OPTH.S42117. (査読有り)

12. In vivo laser confocal microscopy after Descemet's membrane endothelial keratoplasty. Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Ophthalmology. 2013 May;120(5):923-30. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.11.006. (査読有り)

13. Descemet's stripping and non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty for microcornea using 6.0 mm donor grafts. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Ueta Y, Hashimoto Y, Tachi N, Sugiyama K. Clin Ophthalmol. 2013;7:1951-6. doi: 10.2147/OPTH.S50299. (査読有り)

14. A Case of Bilateral Descemet's Membrane and Subepithelial Opacity: In vivo Laser Confocal Microscopy Study.

Hatta Y, Yokogawa H, Kobayashi A, Torisaki M, Sugiyama K. Case Rep Ophthalmol. 2013 Mar 16;4(1):46-52. doi: 10.1159/000350315. (査読有り)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Sugiyama K. Visualization of pre-cut DSAEK and pre-stripped DMEK donor cornea by intraoperative SD-OCT (RESCAN 700) American Academy of Ophthalmology 2015, Nov 16, 2015, in Las Vegas, Nevada (Sands Expo) (U.S.A.)

2. Kobayashi A. The use of intraoperative OCT for DSAEK/DMEK Endothelial keratoplasty group breakfast meeting 2015, Nov 16, 2015, in Las Vegas, Nevada (Sands Expo)

3. Kobayashi A. DMEK for shallow chamber. The 6th Eucornea, September 5th, 2015, Barcelona, Spain (Fira Barcelona Gran Via)

4. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Saito Y, Sugiyama K. Clinical features of glaucoma in cytomegalovirus corneal endotheliitis. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2015, May 1, in Denver, Colorado (Colorado Convention Center) (U.S.A.)

5. Kobayashi A. In vivo visualization of cysts and radial keratoneuritis in Acanthamoeba keratitis. The 30th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April 1st, 2015, Guangzhou, China (Guangzhou Baiyun international convention center)

6. Kobayashi A. Surgical technique for cataract surgery through cloudy cornea. The 4th biennial meeting of the Asia Cornea Society. 2014, Dec 12, Taipei, Taiwan

7. Kobayashi A. DMEK and AMAEK for Asian eyes. The 4th biennial meeting of the Asia Cornea Society. 2014, Dec 11, Taipei, Taiwan.

8. Yamazaki N, Yokogawa H, Kobayashi A, Sugiyama K. In vivo imaging of coin-shaped lesions in cytomegalovirus corneal endotheliitis by anterior segment optical coherence tomography. The 4th biennial

meeting of the Asia Cornea Society. 2014, Dec 11, Taipei, Taiwan.

9. Yokogawa H, Yamazaki N, Kobayashi A, Sugiyama K Mapping of in vivo imaging of dendritic ulcers in patients with herpes simplex keratitis. The 4th biennial meeting of the Asia Cornea Society. 2014, Dec 11, Taipei, Taiwan.

10. Kobayashi A. Murata N, Yokogawa H, Toshinori M, Sugiyama K. Vital dye staining evaluation of internationally shipped pre-stripped donor tissue for Descemet's membrane endothelial keratoplasty. American Academy of Ophthalmology 2014, Oct 20, 2014, in Chicago, Illinois (McCormick Place Convention Center) (U.S.A.) <P presentation>

11. Kobayashi A. Endoillumination assisted DMEK for bullous keratopathy secondary to argon laser iridotomy. Endothelial keratoplasty group breakfast meeting 2014, Oct 20, 2014, in Chicago, Illinois (Hyatt Regency McCormick Place )

12. Kobayashi A. Yamazaki N, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo imaging of radial keratoneuritis in patients with early stage Acanthamoeba keratitis by anterior segment OCT. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2014, May 6, 2014, in Orlando, Florida (Orange County Convention Center) (U.S.A.) <oral presentation>

13. Kobayashi A. In vivo confocal microscopy in clinical practice. World Ophthalmology Congress 2014, April 4, 2014, Tokyo, Japan.

14. Kobayashi A. In vivo microstructural analysis of radial keratoneuritis in Acanthamoeba keratitis using confocal microscopy and anterior segment OCT. World Ophthalmology Congress 2014, April 4, 2014, Tokyo, Japan.

15. Kobayashi A. DMEK for Asian Eyes. World Ophthalmology Congress 2014, April 3, 2014, Tokyo, Japan.

16. Kobayashi A. Development of New Devices for DMEK. World Ophthalmology Congress 2014, April 3, 2014, Tokyo, Japan.

17. Yamazaki N, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Anterior segment OCT findings of radial keratoneuritis in patients with early stage Acanthamoeba keratitis. World Ophthalmology Congress 2014, April 3, 2014, Tokyo, Japan.

18. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Recent trend of surgical therapies for corneal perforation : 10-years experiment. World Ophthalmology Congress 2014, April 3, 2014, Tokyo, Japan.

19. Microstructural analysis of radial keratoneuritis in patients with early stage Acanthamoeba keratitis using in vivo confocal microscopy. Yamazaki N, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013, May 7, 2013, in Seattle, Washington (Washington State Convention Center)

20. Microstructural analysis of the cornea after Descemet membrane endothelial keratoplasty using in vivo confocal microscopy. Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki K, Sugiyama K. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013, May 6, 2013, in Seattle, Washington (Washington State Convention Center)(U.S.A.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：