

A Review

Treatment Strategy for Rejection-free Corneal Transplantation
—Transition from Full-thickness Corneal Transplantation to
Corneal Endothelium Transplantation—

Satoru Yamagami

Department of Corneal Tissue Regeneration, Tokyo University Graduate School of Medicine

Abstract

The avoidance of allograft rejection is the most critical factor for favorable surgical outcome after corneal transplantation. We report experimental data including distribution of white blood cells in human corneas for rejection-free corneal transplantation. We focused on leukocyte trafficking based on the immunological mechanism leading to allograft rejection in a mouse full-thickness corneal transplantation model.

We identified two chemokine-receptors, CCR1 and CCR7 which are functionally relevant to the occurrence of allograft rejection. These chemokine receptors can be new targets for the suppression of allograft rejection after full-thickness corneal transplantation. In the human corneas, bone marrow-derived dendritic cells and monocyte-lineage cells reside constitutively in the normal epithelium and stroma, and may be associated with direct recognition of allo-antigen after corneal transplantation. We

established a mouse model in which cultured allo-corneal endothelium was transplanted onto a bullous keratopathy recipient cornea. During the follow-up period, the transplanted cultured allo-corneal endothelium did not show any sign of allograft rejection.

Our findings demonstrated that a rejection-free mechanism is due not to suppression of immunity or to lack of response, but to failure to recognize the existence of resistance. Realization of the clinical application of cultured allo-corneal endothelium transplantation may be a shortcut to ideal rejection-free corneal transplantation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 266—278, 2008)

Key words : Corneal transplantation, Allograft rejection, Chemokine, Bone marrow-derived cells, Cultured allo-corneal endothelium transplantation

I 緒 言

全層角膜移植手術は約 100 年の歴史をもつ組織移植で¹⁾、他の臓器、組織移植に比べ最も多く行われている移植手術である。米国で年間 45,000 件、我が国においても 2,000 件以上施行されている。米国における移植用ドナー角膜は、概ね充足しているが、それ以外の世界中の国々では深刻なドナー角膜供給不足の状態にある。移植した角膜が手術後に混濁する原因としては、術後の拒絶反応の発生による内皮細胞数の減少が最も多い²⁾。したがって、移植角膜の透明性を維持するためには拒絶反応の発生を予防することが最も重要な術後管理となる。全層角膜移植後の拒絶反応発生機序の解明は主としてマウスモデルを用いて検討されてきている^{3)~5)}。その結果として正常マウス角膜に免疫担当細胞が常に存在していること、これらの細胞が角膜移植後の免疫反応にも関与している可能性などが報告されている^{6)~8)}。しかし、ヒト角膜に関しては免疫担当細胞の存在を体系的に示す報告はなく、角膜由来の免疫担当細胞が角膜移植後拒絶反

応にかかわる可能性があるのかについても未知である。また、研究の進んでいるマウスにおいても移植後の拒絶反応抑制の決め手になる治療法は開発されていない。

全層角膜移植手術は混濁した角膜を治療する切り札として今後も広く行われる術式であることは間違いないが、臨床の場では内皮細胞数減少眼に対する全層角膜移植手術に代わる術式として、深層角膜移植手術が行われるようになってきている^{9)~12)}。この術式は内皮細胞だけが障害されている角膜に対して全層角膜移植手術を行うことで生じる術後の屈折異常の問題を大きく改善するため注目されている。しかし、乱視の大幅な軽減はなされるものの術後の矯正視力は必ずしも十分ではなく、また一眼に一つの角膜を使用するためドナー角膜の供給不足を補うものではない。これに対し実験的には、培養ヒト角膜内皮細胞を家兎の水疱性角膜症の治療などに用いる方法が報告されている^{13)~18)}。この培養ヒト角膜内皮細胞移植は、世界中のドナー角膜不足を一気に解決する可能性をもつもので、近い将来実用化するものと考えられる。しかし、角膜内皮細胞だけを移植するという新しい

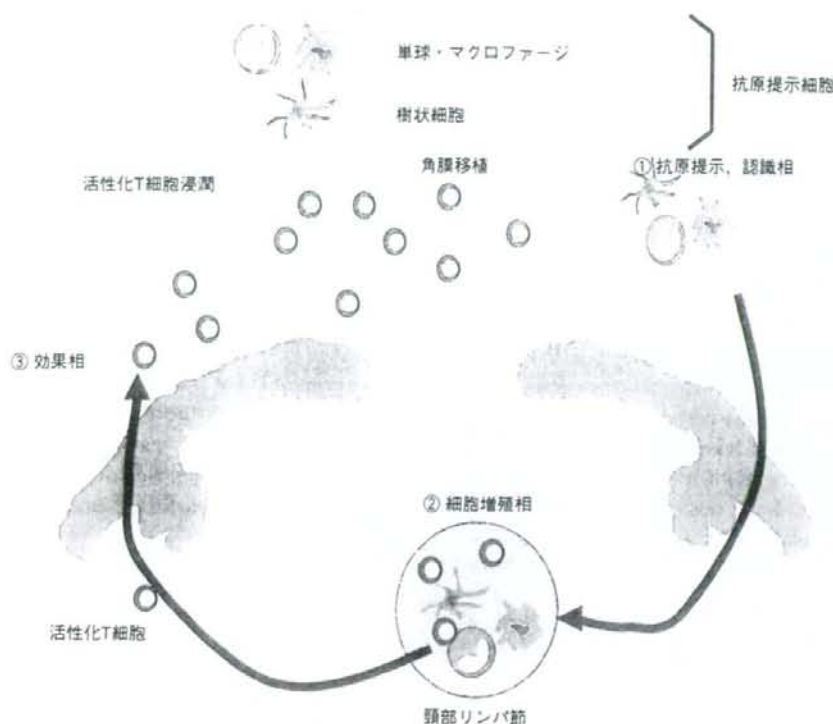


図1 拒絶反応の発生プロセス。

①抗原提示能をもった細胞が抗原情報を頸部リンパ節に運び抗原の提示、認識が行われる抗原提示・認識相、②抗原特異的なT細胞の増殖活性化が起きる細胞増殖相、③活性化したT細胞が角膜局所に浸潤して拒絶反応に導く効果相、に分けて考えることができる。

手術に伴う免疫反応についてはこれまで検討されていない。

このような状況を背景に、マウス全層角膜移植後の拒絶反応抑制法、ヒト角膜に存在する免疫担当細胞の存在と角膜移植後免疫反応にかかわる可能性、およびマウス培養アロ角膜内皮細胞移植の免疫反応の特徴について検討した。

II マウス全層角膜移植後の拒絶反応抑制法

1. 拒絶反応の発生プロセス

拒絶反応の発生プロセスは、抗原提示・認識相、細胞増殖相、効果相という3つの相に大きく分けられる(図1)。抗原提示・認識相は、樹状細胞などの抗原提示能をもつ細胞が、移植された角膜のもつ外来抗原をホストのT細胞に提示し、認識を促す過程である。抗原提示を受けて活性化した成熟樹状細胞は遊走能を獲得し、リンパ管を経てリンパ節に到達する。したがってこの反応は、一般に各所属リンパ節で行われると考えられている。細胞増殖相は、体に入った抗原にだけ反応する細胞を増やす過程である。つまり抗原の提示を受けたT細胞は、2番目のステップとして、Interleukin(IL)-2やInterferon-gamma(IFN- γ)といういわゆるヘルパーT

(Th)細胞の出すTh1サイトカインを分泌しながら、角膜移植では主として頸部リンパ節で、T細胞自身のみならず他のT細胞も活性化し、移植されたアロ抗原特異的なT細胞が増殖すると考えられる。効果相とは、ヒトの角膜移植後の拒絶反応が起き、角膜浮腫、豚脂様角膜後面沈着物、前房内細胞浸潤が起きている状態を意味する。つまり移植された角膜抗原に特異的なT細胞は、移植片局所に移動し、拒絶反応を引き起こすと考えられる。このとき角膜や前房水でも拒絶反応において重要な役割を果たしているのは、Th細胞の中のTh1と呼ばれる細胞群であり、未分化なTh0からIL-12やIFN- γ の誘導により分化し、IL-2やIFN- γ などのサイトカインを分泌し、移植された角膜を拒絶に導くと考えられる¹⁹⁾²⁰⁾。これらの反応には、角膜や前房内局所の細胞移動、角膜とリンパ節間の細胞移動、さらに全身の細胞移動が必須であると考えられるため、我々は一連の細胞移動にかかわる因子としてケモカインに着目した。

2. ケモカイン

ケモカインは、種々の原因によって引き起こされる炎症反応において、局所臓器への特異的な白血球浸潤を惹起する主要決定因子である²¹⁾。そもそも白血球の浸潤なくして炎症反応は起きないことから、このケモカインの重

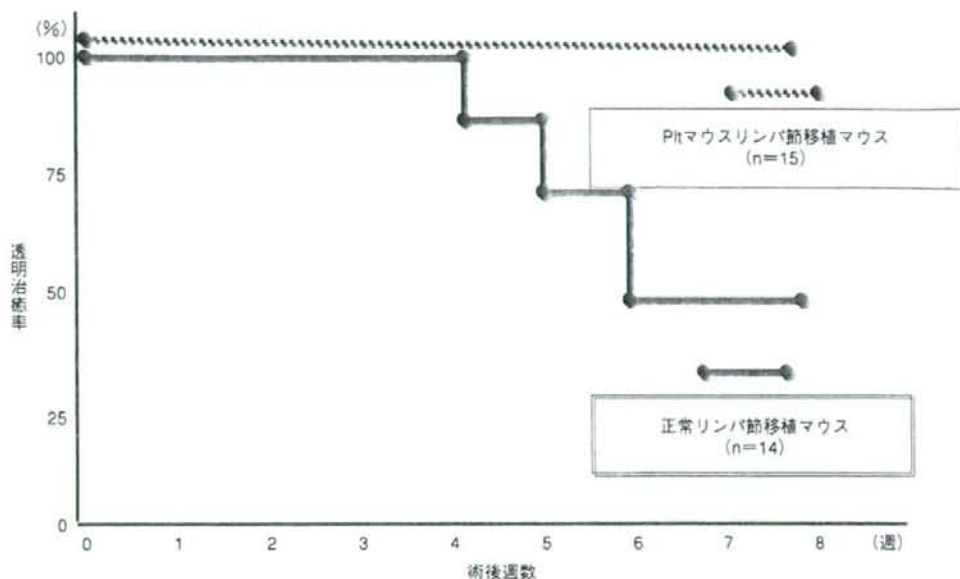


図 2 頸部リンパ節再建マウスの角膜移植後透明治療率。

正常頸部リンパ節移植マウスを宿主としたマウスでは、通常の BALB/c マウスと同様に 50% の C57BL/6 マウスの角膜を拒絶したが、CCL21, CCL19 機能不全の Plt マウスのリンパ節移植マウスでは、拒絶反応は起きなかった。

要性は容易に理解できる。またケモカインの白血球遊走特異性が、各白血球表面上のケモカイン受容体発現レベルで決定されていることも明らかにされてきており、多くの免疫現象との密接なかわかりが検討されてきている。一方、治療という観点からは、特異的白血球浸潤を抑制する安全な方法を提供できれば、従来の薬剤とは異なる方法で多くの疾患治療が可能になると考えられる。

3. 角膜移植後の抗原提示・認識相とケモカイン

正常リンパ節には CCL21/secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) や CCL19/EB11 ligand chemokine (ELC) というケモカインが発現しており、成熟樹状細胞やナイーブ T 細胞が発現する CCR7 というレセプターをもった細胞に対する遊走因子である²²⁾²³⁾。そこでこのケモカイン、ケモカインレセプターの関係が角膜移植後の抗原提示、認識相に關与しているとの仮説を立てた。過去に我々は、マウスから予め頸部リンパ節を切除するとマウス全層角膜移植モデルでは全く拒絶反応が起らなくなることを、そのマウスと同種同系マウスのリンパ節を切除直後に移植しておく、そのマウスは正常に拒絶反応を起こすことを報告した²⁴⁾²⁵⁾。また、Plt/plt マウス (BALB/c バックグラウンド) は CCL21/SLC や CCL19/ELC の機能不全マウスでリンパ節のホーミングや樹状細胞の局在の異常をもつマウスであることが知られていた²⁶⁾。そこでこのリンパ節移植モデルに全身の CCL21/SLC や CCL19/ELC の機能不全 Plt/plt マウスのリンパ節を移植した後、全層角膜移植術を行った。結果として

対照として行った群での 50% の拒絶反応発生率に対して、CCL21/SLC や CCL19/ELC の機能不全 Plt/plt マウスのリンパ節を移植した群では拒絶反応が発生しなかった(図 2)。このことは頸部リンパ節の CCL21/SLC や CCL19/ELC が拒絶反応発生に重要な役割を果たしていることを意味していた。

次に治療応用を目的として抗体によるブロッキングを行った。まず結膜下注射による抗体投与が頸部リンパ節への CCR7 陽性細胞の流入をブロックできるか否かの検討を行うために、全層角膜移植後 0, 1, 3, 5 日目に抗 CCL21/SLC + CCL19/ELC 抗体 4 μ g または対照 IgG 4 μ g をマウスの結膜下に注射し、移植後 6 日目に頸部リンパ節での CCR7 mRNA の発現量および CCR7 陽性成熟樹状細胞 (CD11c⁺ MHC クラス II⁺ CCR7⁺ 細胞) 数をフローサイトメーターにて比較した。図 3A, B に示すように抗体の結膜下注射により、CCR7 mRNA の発現量および CCR7 陽性成熟樹状細胞数は有意に減少していた(図 3)。そこで移植後 0, 1, 3, 7, 10, 14 日目に抗体を結膜下注射により投与し臨床経過を比較した。術後 8 週目に対照抗体投与群で 40% (n=15) であった拒絶反応非発生率は、抗 CCL21 + CCL19 抗体投与群で 83% (n=18) に有意に上昇した。これらの結果は、CCL21/SLC や CCL19/ELC が角膜移植後拒絶反応発生に重要な役割を果たしており、新たな治療のターゲットとなる可能性があることを示している。さらに、ブロッキング抗体の結膜下注射で頸部リンパ節の CCR7 陽性

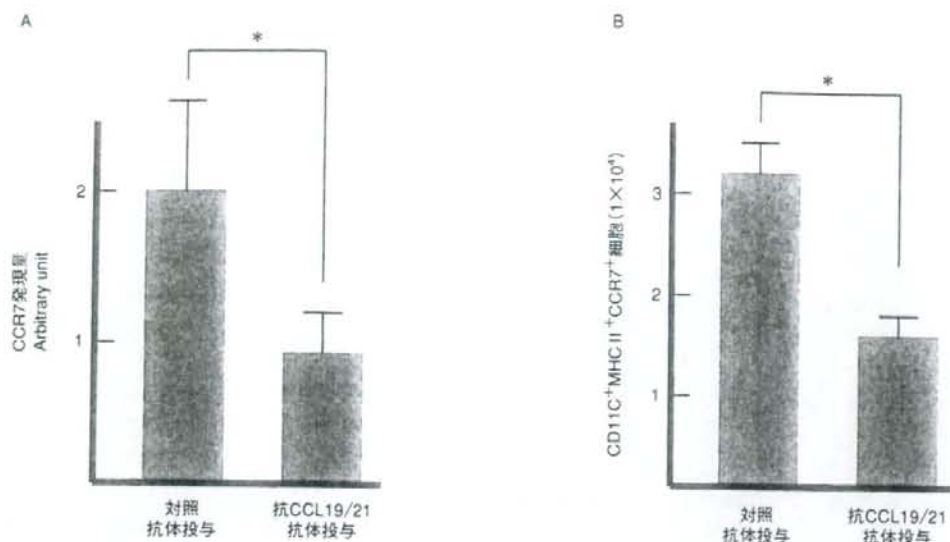


図3 頸部リンパ節のCCR7 mRNA発現量とCCR7陽性成熟樹状細胞数。

全層角膜移植後に抗CCL21+CCL19抗体投与群、対照抗体投与群での頸部リンパ節のCCR7 mRNA発現量とCCR7陽性成熟樹状細胞数を比較した。A:半定量的polymerase chain reaction(PCR)法で比較した。頸部リンパ節におけるCCR7 mRNA発現量は、抗CCL21+CCL19抗体投与群で対照抗体投与群に比し有意に減少した。B:フローサイトメーターによりCCR7陽性成熟樹状細胞(CD11c⁺MHCII⁺CCR7⁺細胞)数を比較した。頸部リンパ節におけるCCR7陽性成熟樹状細胞数は、抗CCL21+CCL19抗体投与群で対照抗体投与群に比し有意に減少した。* p<0.01。

細胞数を減少させ、拒絶反応を抑制できたという事実は、結膜下注射という投与方法が頸部リンパ節に対する薬剤投与方法として治療効果をもつということも意味している。頸部リンパ節の切除で角膜移植後の拒絶反応が全く起きないことから明らかなように¹⁹⁾²⁰⁾、所属リンパ節である頸部リンパ節が拒絶に導く中心的な役割を果たしていることは間違いない。これまで一般に結膜下注射という投与方法は眼局所の薬剤濃度を上げるために用いられているが、所属リンパ節に対する薬剤投与方法としても有用であると考えられた。

4. 角膜移植後の効果相とケモカイン

次に拒絶反応発生の効果相、すなわち拒絶反応発生時に着目した検討を行った。まず効果相において重要なケモカインレセプターを決定するため、以下の4群の眼球で発現量の多いケモカインレセプターを決定した。ホストはC57BL/6、グラフトはBALB/cを用いて、手術眼は同種異系移植群で約半数が拒絶される術後3.5週目に摘出した。

- ① 正常マウス眼
- ② 同種同系角膜移植後マウス眼
- ③ 同種異系角膜移植後の移植片生着眼
- ④ 同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼

結果として図4に示すように同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼においてのみ、CCR1 mRNA、CCR2 mRNAおよびCCR5 mRNAが過剰発現していた²¹⁾。そこで機

能的に重要なケモカインレセプターを決定するためにCCR1、CCR2およびCCR5ノックアウトマウスをホストとする全層角膜移植術を行った。結果としてCCR1ノックアウトマウスをホストとした全層角膜移植の生着率は、60%(n=10)で対照の20%(n=10)に比し有意に高かった²¹⁾。このCCR1ノックアウトマウスでは対照マウスに比べて、CD3陽性T細胞の浸潤が少なく(術後12日目)、角膜におけるTh1サイトカイン(IL-2、IFN- γ)のmRNA発現レベルが低かった。角膜移植後の細胞性免疫反応では、細胞障害性T細胞反応より遅延型過敏反応が重要であるため²²⁾遅延型過敏反応を検討したところ低値を示した²¹⁾。以上のことからCCR1というケモカインレセプターは、全層角膜移植後拒絶反応発生に機能的にかかわることが明らかとなった。

次に治療応用が可能かどうかを検討するためにCCR1アンタゴニスト(A4B7、Novartis社)の経口投与(30mg/kg 術後毎日1日2回投与)を行って移植角膜の生着率を検討した(ホスト:C57BL/6マウス、グラフト: BALB/cマウス)。基剤投与群で17%(n=6)であった生着率が、CCR1アンタゴニスト投与によって52%(n=27)と有意に高い生着率であった(未発表データ)。この結果からCCR1が全層角膜移植術後拒絶反応抑制の治療のターゲットとなりうるものと考えられた。本研究は効果相に発現するケモカインレセプターから重要な因子の絞り込みを行ったものであるが、CCR1陽性樹状細胞

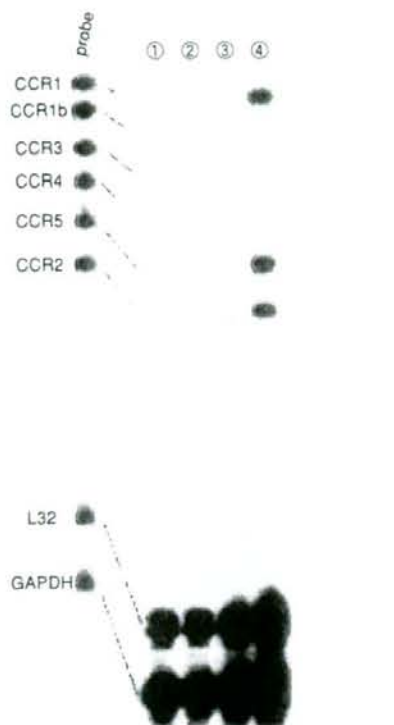


図 4 Ribonuclease protection assay (RPA)法によるケモカインレセプターのスクリーニング。大きさの異なる複数のプローブを用いることで1サンプル中の複数の mRNA の定量を行う方法。同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼で、CCR1 mRNA, CCR2 mRNA および CCR5 mRNA が過剰発現している。
① 正常マウス眼、② 同種同系角膜移植後マウス眼、③ 同種異系角膜移植後の移植片生着眼、④ 同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼

は角膜移植後早期から発現しており²⁷⁾、CCR1のリガンドの RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP) 1a も術後早期から発現していることから²⁸⁾、CCR1 というレセプターは効果相のみならず抗原提示、認識相にも関与しながら拒絶反応発生にかかわっているものと考えられる。

III ヒト角膜に存在する免疫担当細胞の存在と角膜移植後免疫反応にかかわる可能性

1. ヒト角膜に存在する免疫担当細胞

マウスに関しては角膜移植モデルを用いた検討から上述のような機序が明らかになってきているが、ヒトの角膜においてはそもそも抗原提示能をもった細胞が正常の角膜に存在するのか、最近進歩した各種細胞マーカーを用いて系統立った研究は報告されていない。もちろんマウスモデルでのような機能解析をヒトで行うことはできないが、ヒトの角膜に存在している抗原提示能をもつ細胞をまず明らかにすることでマウスモデルでの現象がヒ

トにも当てはまる可能性があるか否かが明らかになる。そこでまず各種の白血球マーカーを用いて角膜に存在する白血球の同定、分類を試みた。結果としてヒト角膜上皮層には、3つのフェノタイプからなる未熟樹状細胞が²⁹⁾、角膜実質層には、樹状細胞、マクロファージを含めた単球系細胞が³¹⁾、結膜下にはマクロファージ系細胞を中心とした細胞³²⁾が構造的に分布していた。

2. ヒト角膜実質免疫担当細胞の分布メカニズム

無血管の正常角膜実質における白血球がどのようにして分布するのかが明らかでない。しかし分化した白血球が角膜で自己複製することは考えにくく、周辺部の血管から遊走してくることに疑問の余地はないと考えられた。そこで角膜実質細胞と上皮細胞が何らかのケモカインを産生し、特異的ケモカインレセプターをもつ白血球を角膜の中央部まで集めているとの仮説を立てた。まずヒト角膜実質細胞と単球系細胞を分離してそれぞれの細胞を検討するため、米国アイバンクの研究用角膜実質から磁気ビーズによる細胞の分離を行った。方法は、角膜実質を一晩コラゲナーゼ処理して細胞成分を採取した。磁気ビーズ付き抗 CD45 抗体を反応させ、ヒト角膜実質細胞と白血球を分離した。次にヒト角膜実質単球系細胞のケモカインレセプター mRNA の発現を検討するため、multiplex polymerase chain reaction (PCR) システムを用いて多数のケモカインレセプターの中から発現しているケモカインレセプターを検討したところ、ヒト角膜実質単球系細胞は CCR2 mRNA と CCR7 mRNA を発現していることが明らかになった³³⁾。またこれらの細胞は、免疫細胞化学的に抗 CCR2 抗体陽性であったことから、CCR2 が角膜実質中の細胞分布を決定する候補因子と考えられた。CCR2 は CCL2(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)ケモカインのレセプターであるので、今度は角膜実質・上皮細胞が、CCR2 の走化性因子の CCL2(MCP-1)を発現するかどうかを検討した。結果としてヒト角膜実質細胞、ヒト角膜上皮細胞は、CCL2(MCP-1)mRNA を発現し、フローサイトメーターでも角膜実質・角膜上皮細胞が CCL2(MCP-1)蛋白質を発現していることが明らかとなった³³⁾。

そこで角膜由来の細胞がもつケモカイン・ケモカインレセプターが実際に機能しているかを明らかにするため、ボイデン・チャンバーによる走化性の検討を行った。CCL2(MCP-1)に対するヒト角膜実質の CD45(汎白血球マーカー)陽性細胞の走化性を検討したところ、ヒト角膜実質の CD45 陽性細胞は有意に CCL2(MCP-1)に対して走化性を示した(図 5A)。次にヒト角膜実質細胞の培養上清に対するヒト角膜実質の単球系細胞の走化性を同じくボイデン・チャンバーによって検討した。ヒト角膜実質細胞培養上清に対して有意に高い走化性を示したヒト角膜実質の単球系細胞は、抗 CCL2(MCP-1)抗体を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては走化性が

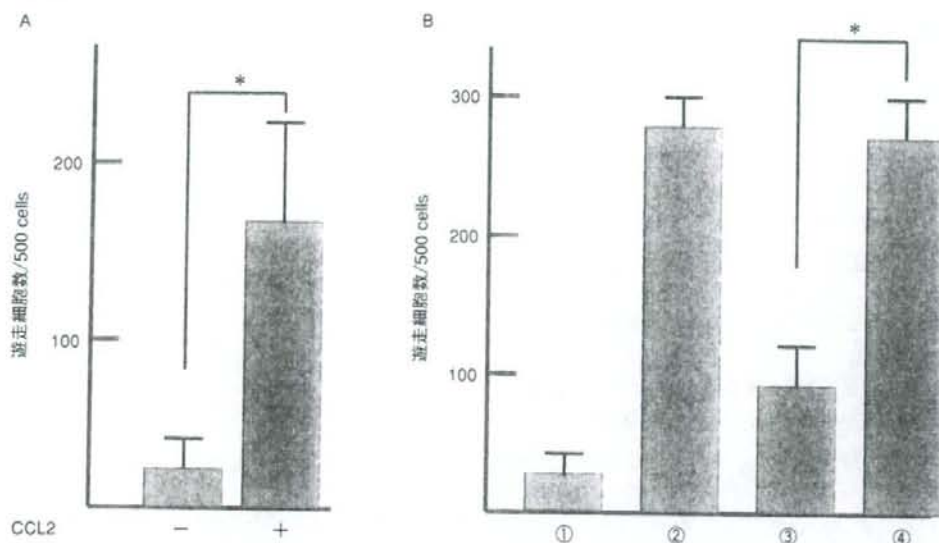


図5 ボイデン・チャンバーによる走化性の検討。

ボイデン・チャンバーは、ケモカインなどの走化性因子がどの程度の細胞を移動させるかをみることで走化性を定量的に評価する方法。A: ヒト角膜実質由来 CD45(汎白血球マーカー)陽性細胞の CCL2(MCP-1) に対する走化性。CCL2(MCP-1)は、CCL2(MCP-1)を反応させない場合に比べて有意にヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞を遊走させた。B: ヒト角膜実質細胞の培養上清に対するヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞の走化性。以下の4つの溶液の走化性を検討した。① Mediumのみ、② ヒト角膜実質細胞培養上清、③ ヒト角膜実質細胞培養上清+抗 CCL2 抗体、④ ヒト角膜実質細胞培養上清+対照抗体。ヒト角膜実質細胞培養上清に対して有意に高い走化性を示したヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞は、抗 CCL2(MCP-1) 抗体を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては走化性が低下している。* $p < 0.01$ 。

低下し、対照 IgG を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては、ヒト角膜実質細胞培養上清と同程度の走化性を示した(図 5B)。以上の機能解析から、単球系細胞がヒト角膜実質中に分布するメカニズムに CCL2-CCR2 が関与している可能性が考えられた。

3. ヒト角膜の免疫担当細胞による直接認識の可能性
抗原認識パターンには2つある。それは移植片中のドナー由来の組織適合抗原(major histocompatibility, MHC)分子を直接 T 細胞レセプターが認識する「直接認識」とレシビエント抗原提示細胞によって処理された抗原ペプチドがレシビエント MHC によって提示され、T 細胞レセプターに認識される「間接認識」の2つである。通常の臓器移植では臓器自体に MHC 陽性細胞が多数存在しているため直接認識が中心とされているが、角膜移植では角膜自体に MHC 陽性の細胞がほとんど存在しないとされていたこともあり間接認識が中心であろうと考えられていた³⁰。しかし、マウス角膜の中央部でも抗原提示能をもつ細胞が存在することが報告された⁶¹⁻⁶³。そのため角膜に存在する MHC 分子をもった細胞を直接 T 細胞が認識する「直接認識」によるパターンもありうるのではないかと考えられるようになってきた。実際にマウス角膜移植後には頸部リンパ節でドナー角膜由来の MHC クラス II 陽性の樹状細胞が検出され、抗原の直接

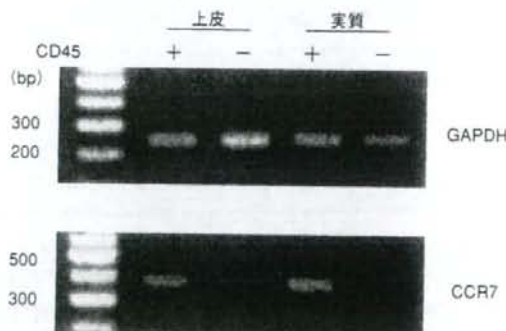


図6 ヒト角膜上皮、実質由来 CD45 陽性細胞の CCR7 mRNA の発現。

CD45 陽性磁気ビーズで分離した白血球と各組織由来細胞の CCR7 mRNA の発現を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検討した。すべてのサンプルで house keeping gene の GAPDH は検出された。ヒト角膜上皮、実質ともに CD45 陽性磁気ビーズで分離した白血球に CCR7 mRNA を発現している。

認識も実際に起こっていることが示された³⁵。角膜移植においてこのようなグラフトからホストに至る白血球の動態が直接証明されたことはこれまでになく興味深い。

そこでマウスで示された抗原の直接認識がヒトの角膜移植後にも起きる可能性があるのか否かを検討した。ヒトではもちろんマウスのような機能解析は不可能であるため、角膜上皮、実質に存在する抗原提示細胞がリンパ節に存在する CCL21/SLC や CCL19/ELC に対して遊走能をもつ、すなわち CCR7 を発現するのか、また上皮に存在する未熟樹状細胞が成熟樹状細胞化するかどうかを調べることで、ドナー角膜由来の細胞がホストのリンパ節に到達し抗原提示にかかわれるか否かを検討した。図 6 に示すようにヒト角膜から CD45 陽性磁気ビーズで分離した角膜上皮、実質由来の白血球は、CCR7 mRNA を発現していた。また同じく分離した角膜上皮の未熟樹状細胞では、活性化型表面マーカーの CD40、CD86 は陰性であった。これを Tumor necrosis factor (TNF)- α (20 ng/ml) およびリポ・ポリサッカライド (LPS, 100 ng/ml) で 3 日間培養刺激したところ CD40、CD86 陽性の成熟樹状細胞に変化した³⁰⁾。これらはまだ証拠として十分ではないが、ヒトの角膜においても角膜由来の抗原提示細胞が抗原の直接認識にかかわる可能性があることを示すものと考えられた。

IV マウス培養アロ角膜内皮細胞移植の免疫反応の特徴

1. 角膜内皮細胞移植

水疱性角膜症という角膜内皮細胞のみの障害に対してこれまで全層角膜移植が行われていた。これに対し最近、臨床、研究の分野で内皮細胞のみを移植しようという試みがなされてきている。臨床的には、角膜内皮に加えてごく薄い実質をドナー角膜より除去して同様に内皮細胞と実質を除去した水疱性角膜症眼に移植する方法、Descemet 膜のみを除去した角膜に移植する方法が行われている¹²⁾。研究の分野では、ヒト角膜内皮細胞の前駆細胞を注射で前房内へ入れてうつ伏せ姿勢を維持することで内皮面に貼り付ける方法、培養ヒト内皮細胞単独のシートを作製し、全層打ち抜いた角膜内皮に貼り付ける方法、薄いコラーゲンを Descemet 膜の代わりとしてその上に培養ヒト角膜内皮細胞を播種し、シートを作製する方法^{13)~18)}などが報告され、臨床応用目前と考えられる。しかしながら内皮細胞のみを移植するという術式は新しいもので、これまでアロ抗原をもつ内皮細胞のみを移植した場合の免疫反応に関する知見は明らかになっていなかった。そこでマウスの角膜内皮細胞のセルラインをマウス角膜の裏面に接着させ移植するモデルを作製し、マウスの全層移植モデルとの免疫反応の差を明らかにする検討を行った³⁶⁾。

2. マウス培養アロ角膜内皮細胞移植モデルの作製と拒絶反応発生率

まず 0.05% 塩化ベンザルコニウムを前房内へ注入し、ホストの角膜内皮細胞を除去することでホスト角膜が水

表 1 拒絶反応発生率(術後 6 週目)

群	眼数	拒絶反応発生率(%)
同系全層	14	0
同系内皮除去	13	0
アロ全層	19	74
培養アロ内皮	15	0
シャム手術	14	79

同系内皮除去群の 7 週目に移植片の浮腫改善例がみられたため、術後経過観察期間を 6 週間とした。培養アロ内皮群では 3 眼で透明性の維持できない眼があったが、組織学的に細胞浸潤を認めなかったため内皮細胞数減少による角膜浮腫とした。

毒性角膜症となる病態モデルをはじめて作製した。これは従来の正常マウス角膜に移植するモデルとは異なり、今回はじめて我々が行った臨床の水疱性角膜症に近いマウス角膜移植モデルである。次に不死化した培養マウス角膜内皮細胞 (C3H マウス由来) を Pkh 染色し、内皮細胞を除去した BALB/c マウス角膜の Descemet 膜上に播種、遠心後、2 日間培養し、再構築角膜とした。これにより内皮細胞だけが C3H で実質と上皮が BALB/c マウス由来の角膜が作製できた。ホストはすべて水疱性角膜症の BALB/c マウス、グラフトは C3H マウス、BALB/c マウスおよびこれらのキメラ角膜を用いた。グラフトとして以下の 5 つを用いて全層角膜移植を行った

- ① ホストと同種同系の BALB/c マウス角膜を移植した同系全層群
- ② BALB/c マウスの角膜内皮除去角膜を移植した同系内皮除去群
- ③ ホストと同種異系の C3H マウス角膜を用いたアロ全層群
- ④ BALB/c マウスの角膜実質と上皮に培養 C3H 角膜内皮細胞を付着させ移植した培養アロ内皮群
- ⑤ C3H マウスの角膜実質と上皮に培養 C3H 角膜内皮細胞を付着させ移植したシャム手術群

拒絶反応発生の定義は、角膜実質の混濁のため虹彩血管の透見困難な状態としたが、角膜浮腫のみで実質混濁を伴わないものは、組織学的に単核球の浸潤を認めた場合に拒絶反応発生とした。浸潤を認めない場合は内皮細胞数減少による角膜浮腫として拒絶反応には含めなかった。5 群の拒絶反応発生率を表 1 に示す。マウスの角膜内皮細胞は除去しても再増殖を起こすため、まず同系内皮除去群において何週間の経過で角膜浮腫が消失するかを検討した。その結果、術後 6 週までは全例で浮腫が持続したが、7 週目以降で角膜浮腫の回復する角膜が存在したため、本モデルでの臨床経過の観察期間を 6 週間と定めた。経過観察期間中、同系全層群ではすべて透明性

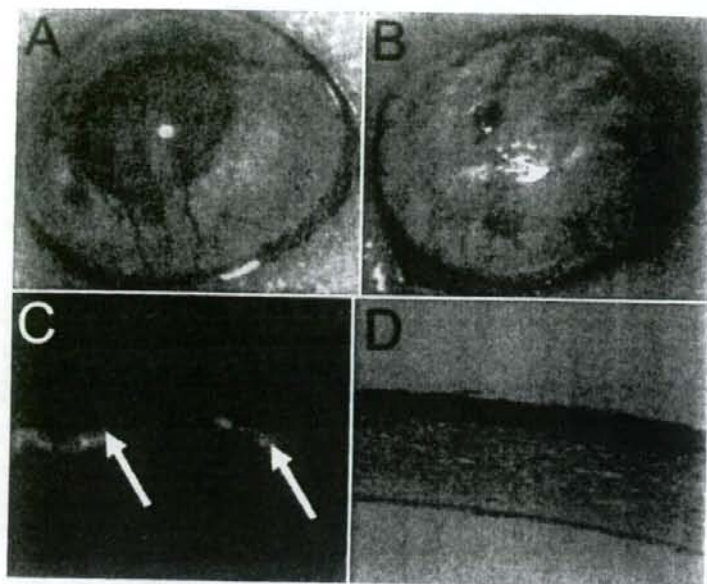


図7 前眼部写真および組織所見(術後4週目)。

A: アロ全層群の前眼部写真。移植角膜は浮腫により盛り上がって見え、前房内が見えにくくなっている。B: 培養アロ内皮群の前眼部写真。角膜浮腫はなく透明性を維持している。C: 培養アロ内皮群の内皮面の組織所見。角膜内皮はPkh染色で赤く染色されている(矢印)。D: 培養アロ内皮群のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色所見。グラフト内に浸潤細胞はほとんどみられず、拒絶反応は発生していないと考えられる。

を維持した。アロ全層群とシャム手術群はほぼ同様に拒絶反応を起こしていたが、培養アロ内皮群では拒絶反応が起きなかった。代表的なアロ全層群と培養アロ内皮群の前眼部写真と培養アロ内皮群の組織所見を示す(図7)。これらの群について術後4週目に遅延型過敏反応を検討し、さらに各群のマウスの脾臓を摘出し、C3Hの脾細胞に対する混合リンパ球培養試験を行ったところ、培養アロ内皮群では角膜の臨床経過によく一致し、どちらも陽性所見を示さない結果となった。以上のように、培養アロ角膜内皮細胞移植では *in vivo*, *in vitro* ともに全層角膜移植とは異なり、拒絶反応発生を示す所見は全く認められなかった。

3. 培養アロ角膜内皮細胞移植後の拒絶反応非発生メカニズム

一般にアログラフトに対して拒絶反応が起きない主な理由として以下の3つの可能性が考えられる。それらは、アロ抗原に対し特異的な抑制をかける免疫抑制(suppression)、アロ抗原を認識しているが反応を起こさない不応答(anergy)、アロ抗原を認識していない免疫無視(ignorance)である。そこで培養アロ角膜内皮細胞移植後の拒絶反応非発生メカニズムの検討を行った。

1) 養子移入法による制御性T細胞(免疫抑制能をもつT細胞)産生の検討

培養アロ角膜内皮細胞移植後8週目および正常マウス

の脾細胞由来の単一細胞を正常BALB/cマウスの静脈に注射した(5×10^7 個/匹)。これらのマウスにC3Hマウス角膜の全層移植を行い、両群の術後拒絶反応発生率を比較した。培養アロ角膜内皮細胞移植後に制御性T細胞(免疫抑制能をもつT細胞)が産生されていれば養子移入マウスで拒絶反応発生率が低下するはずだからである。結果として培養アロ角膜内皮細胞移植後の脾細胞養子移入マウスで拒絶反応発生率は対照に比べて低下せず、制御性(免疫抑制性)T細胞は産生されていない、すなわち培養アロ角膜内皮細胞移植により免疫抑制は起きていないものと考えられた。この結果は免疫抑制がかかることとされる全層角膜移植後長期生着眼における結果³⁷⁾とは異なっていた。また前房内に上皮を剝離した角膜を入れると前房関連免疫偏位(anterior chamber-associated immune deviation, ACAID)により免疫抑制がかかることの報告³⁸⁾を踏まえて培養アロ内皮細胞移植後にACAIDの誘導を検討したが、本モデルではACAIDは誘導されていなかった。

2) アロ抗原感作後の培養アロ角膜内皮細胞移植

予めアロ(C3Hの脾細胞)抗原感作(1×10^7 個/匹)の細胞を皮下に注射を行ったBALB/cマウスに培養アロ角膜内皮細胞移植術を行い、正常BALB/cマウスに培養アロ角膜内皮細胞移植術を行った群と拒絶反応非発生率を検討した。結果として角膜内皮細胞に反応するT細胞

が予め存在しても拒絶反応は発生しないことから、培養アロ角膜内皮細胞は移植されていてもその存在を宿主角膜が認識していない免疫無視の可能性が高いと考えられた。しかし、まだアロ抗原感作後の内皮細胞移植によって不応答が得られた可能性も完全には否定できなかったため、さらに術後 8 週目に遅延型過敏反応の有無を検討したところ、移植されたアロ角膜内皮細胞は拒絶されていないにもかかわらず遅延型過敏反応は検出された。すなわち間違いなく抗原の認識された状態で細胞性免疫反応が検出されたことから、本モデルにおいて不応答は誘導されていないことが明らかとなった。

以上の結果より培養アロ角膜内皮細胞を移植して拒絶反応が発生しない理由は、免疫抑制や不応答によるのではなく、アロ抗原を認識しない免疫無視によっていると考えられた。角膜内皮は前房水に面した角膜裏面という特異な解剖学的な位置に存在している。この位置では Descemet 膜を白血球が通過できない可能性が高いことを考慮すると抗原認識可能な経路は前房水だけとなるため、ホストに認識される確率が極端に下がる可能性がまず考えられる。また Fas をもつ浸潤細胞にアポトーシスを起こす FasL (CD95 L)^{39,40} や T 細胞の活性化を抑制する B7-H1 (PD-L1)⁴¹ を角膜内皮細胞がもつという細胞自体の特殊性も、培養アロ角膜内皮細胞移植において免疫無視という特殊な状態を起こしている原因ではないかと考えられる。

V まとめ

マウス全層角膜移植モデルにおける拒絶反応発生メカニズムから白血球の移動に注目し、拒絶反応発生に機能的に参与する CCR1 および CCR7 という 2 つのケモカインレセプターを見出した。これらは全層角膜移植後拒絶反応抑制法につながる可能性のある新しいターゲットとして臨床応用が期待される。さらに結膜下注射という投与方法が単に眼局所の薬剤濃度を上げるだけでなく、所属リンパ節に対するドラッグデリバリー法ともなっているということも付け加えておきたい。次に 2 つめのテーマとして取り上げた正常ヒト角膜に存在している樹状細胞、単球系細胞をはじめとする白血球の存在は重要である。今回述べた拒絶反応発生にかかわりうること以外に、外来抗原のパターン認識レセプター、toll-like receptor を発現し³¹、無血管の角膜において細菌防御の first line として重要な役割を果たしていると考えられる。細隙顕微鏡での前眼部観察という日常診療においても意識しておきたい事実である。最後に取り上げた培養アロ角膜内皮移植の免疫反応については、抗原の存在自体が認識されない免疫無視により拒絶反応が起きにくいことを報告した。角膜内皮細胞は角膜の透明性を維持する最も重要な細胞であり、また角膜移植を必要とする原因疾患も角膜内皮細胞数減少が最も多い。角膜内皮細胞

は、Descemet 膜と前房水に挟まれる解剖学的位置関係やこの細胞のもつ免疫学的な性質から得られる全身の組織の中でも類まれな細胞である。この特異な細胞の免疫特権を最大限に利用するためにも、培養アロ角膜内皮移植術を臨床の場で実現すること自体が今回の報告のテーマである「拒絶反応のない理想的な角膜移植手術」により近づくことになるものと私は考えている。

文 献

- 1) Zirm EK : Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg* 5 : 258-261, 1989.
- 2) Yamagami S, Suzuki Y, Tsuru T : Risk factors for graft failure in penetrating keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 74 : 584-588, 1996.
- 3) Streilein JW : Immunobiology and immunopathology of corneal transplantation. *Chem Immunol* 73 : 186-206, 1999.
- 4) Niederkorn JY : The immune privilege of corneal grafts. *J Leukoc Biol* 74 : 167-171, 2003.
- 5) Hori J, Niederkorn JY : Immunogenicity and immune privilege of corneal allografts. *Chem Immunol Allergy* 92 : 290-299, 2007.
- 6) Brissette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ, Hendricks RL : Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2264-2271, 2002.
- 7) Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR : Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 639-646, 2002.
- 8) Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR : The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 581-589, 2003.
- 9) Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH : A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 17 : 618-626, 1998.
- 10) Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH : Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology* 107 : 1850-1856, 2000.
- 11) Terry MA, Ousley PJ : Rapid visual rehabilitation after endothelial transplants with deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK). *Cornea* 23 : 143-153, 2004.
- 12) Gorovoy MS : Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 25 : 886-889, 2006.
- 13) Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al : Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial

- cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 800-806, 2004.
- 14) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al: Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2992-2997, 2004.
 - 15) Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, et al: Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 89: 134-137, 2005.
 - 16) Mimura T, Yamagami S, Usui T, Ishii Y, Ono K, Yokoo S, et al: Long-term outcome of iron-endocytosed cultured corneal endothelial cells transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res* 80: 149-157, 2005.
 - 17) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al: Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3128-3135, 2005.
 - 18) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al: Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3637-3644, 2005.
 - 19) Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, et al: Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation* 66: 1504-1510, 1998.
 - 20) Sano Y, Osawa H, Sotozono C, Kinoshita S: Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1953-1957, 1998.
 - 21) Luster AD: The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 129-135, 2002.
 - 22) Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O: Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 273: 7118-7122, 1998.
 - 23) Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST: Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162: 2472-2475, 1999.
 - 24) Yamagami S, Dana MR: The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunization and graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1293-1298, 2001.
 - 25) Yamagami S, Dana MR, Tsuru T: Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. *Cornea* 21: 405-409, 2002.
 - 26) Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al: Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-60, 1999.
 - 27) Hamrah P, Yamagami S, Liu Y, Zhang Q, Vora SS, Lu B, et al: Deletion of the chemokine receptor CCR1 prolongs corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1228-1236, 2007.
 - 28) Yamada J, Ksander BR, Streilein JW: Cytotoxic T cells play no essential role in acute rejection of orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 386-392, 2001.
 - 29) Yamagami S, Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Huq S, Dana MR: Early ocular chemokine gene expression and leukocyte infiltration after high-risk corneal transplantation. *Mol Vis* 11: 632-640, 2005.
 - 30) Yamagami S, Yokoo S, Yamagami H, Amano S, Ebihara N: Distinct population of dendritic cells in normal human donor corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4489-4494, 2005.
 - 31) Yamagami S, Ebihara N, Usui T, Yokoo S, Amano S: Bone marrow-derived cells in normal human corneal stroma. *Arch Ophthalmol* 124: 62-69, 2006.
 - 32) Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Ebihara N: Characterization of bone marrow derived cells in the substantia propria of the human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 4476-4481, 2007.
 - 33) Ebihara N, Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Murakami A: Involvement of CCL2-CCR2 interaction in monocyte-lineage cell recruitment of normal human corneal stroma. *J Immunol* 178: 3288-3292, 2007.
 - 34) Sano Y, Ksander BR, Streilein JW: Langerhans cells, orthotopic corneal allografts, and direct and indirect allorecognition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1422-1431, 2000.
 - 35) Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR: Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J Exp Med* 195: 259-268, 2002.
 - 36) Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, et al: A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea* 2007 (in press).
 - 37) Yamada J, Hamuro J, Sano Y, Maruyama K, Kinoshita S: Allogeneic corneal tolerance in rodents with long-term graft survival. *Transplantation* 79: 1362-1369, 2005.
 - 38) Yamada J, Streilein JW: Induction of anterior chamber-associated immune deviation by corneal allografts placed in the anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2833-2843, 1997.

- 39) Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, Yamagami H, Kayagaki N, Yagita H, et al : Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *Transplantation* 64 : 1107—1111, 1997.
- 40) Hori J, Joyce NC, Streilein JW : Immune privilege and immunogenicity reside among different layers of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3032—3042, 2000.
- 41) Hori J, Wang M, Miyashita M, Tanemoto K, Takahashi H, Takemori T, et al : B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 177 : 5928—5935, 2006.
-

Comment: 西田 輝夫

角膜移植に関する法体制が整備され、ほぼ現在と同じような角膜移植が我が国でも行われるようになって丁度50年が経過した。今日では、一つの確立した視機能回復手術として角膜移植が行われており、その術後成績もある程度満足できるところに到達してきている。しかしながら、提供角膜の絶対的な不足という社会的な問題に加え、拒絶反応や眼圧管理など、よりよい術後成績のためにまだまだ解決せねばならない医学的問題が山積している。幸い角膜の移植に関しては、心臓や肝臓など他の臓器の移植に比し拒絶反応の発生頻度は比較的少なく、またほとんどの例で副腎皮質ステロイドによりある程度抑制できるものの、今回の宿題報告で山上 聡氏がその演題名に掲げられているように「拒絶反応のない理想的な角膜移植手術」は、我々の夢でもある。いくつかの方策が考えられるが、一つは全く人工的な角膜の開発であり、もう一つは拒絶反応の免疫学的な機序を明らかにして術後に特異的な免疫反応の抑制をかけることである。また、現在急速に開発されているように、全層の角膜を移植するのではなく必要な角膜の部分のみを移植することも、拒絶反応の頻度を下げることに役立つと考えられる。

山上氏は、マウス全層角膜移植モデルを用いてエレガントな方法で、拒絶反応には所属リンパ節で発現されるケモカインであるCCL21とCCL19が関与していることを明らかにし、さらに角膜実質中の関与するケモカイン受容体がCCR1およびCCR7であることを示された。このように移植された角膜実質中の細胞を中心に、ホストの所属リンパ節に至る白血球の動態およびその移動に関与するケモカイン系を明確にすることにより、今後角膜移植後の拒絶反応の抑制という治療法を開発する際の分子標的を示された。

今まで角膜実質の主たる構成細胞である線維芽細胞に加え、樹状細胞や単球系細胞などの生理的な機能はあまり明確にされていなかったが、今回の報告で、所属リンパ節での抗原認識のみならず、角膜内で直接抗原が提示され認識される可能性を示された。

一方、パーツ移植の一つの例として角膜内皮移植の動物モデルを確立され、きわめて興味深いことに、培養アロ角膜内皮移植では拒絶反応が生じないことを示された。内皮移植では、その解剖学的な特性から異種抗原を認識しない免疫無視であると考えられる。角膜は皮膚とその発生を同じにする組織であるが、透明性の獲得と交換にさまざまな生体防護反応を失っていると考えられる。今回示されたこともきわめて興味ある現象であり、今後より深くその機序を解明されていくことを期待する。

山上氏は、角膜を中心とする前眼部における免疫反応を中心に、細胞のレベル、サイトカインのレベルあるいは今回のようにケモカインのレベルで、今まで多くの業績を積み重ねておられる。今回、宿題報告で提示された知見をもとに今後さらに理想の角膜移植手術を目指して研究を深めていかれ、いつの日か我々が実際の臨床の場で拒絶反応を克服して角膜移植を行う日が来ることを心より希望する。

先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ

Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy

山田 昌和*

はじめに

先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ (congenital hereditary endothelial dystrophy: CHED) は1893年に Laurenceにより初めて報告されたまれな先天性角膜ジストロフィであり¹⁾、わが国でも少数の報告例がある。本疾患は先天性の水疱性角膜症とも言えるべき疾患であり、さまざまな名称が付けられていたが、Pearceらにより提唱されたCHEDが現在は広く用いられている^{2,3)}。遺伝形式には常染色体優性遺伝と劣性遺伝の両方があり、前者をCHED1、後者をCHED2とよぶ。両者の責任遺伝子は異なることがわかってきており、臨床的にも違いがみられる。

非常にまれな角膜ジストロフィであるが、乳幼児の両眼性の角膜混濁を診た場合には鑑別疾患の一つである。幼少時より発症するために視性刺激遮断弱視の問題があるが、場合によっては角膜移植の適応となる。ここでは本症の臨床所見、検査所見、鑑別診断について概説する。

I 臨床所見および臨床経過

両眼の角膜混濁が生直後から生後1~2年以内に生じることがほとんどで、進行はごく緩徐であることが多い(図1)。視力予後は一般に不良であり、特に眼振を伴う場合は視力不良のサインである。ただし、発症時期が遅い症例や混濁が著明でない症例では、ある程度の視力の発達がみられる。角膜混濁は内皮機能不全による実質浮腫によるものであり、角膜厚は正常の2~3倍にまで増

加していることもある。通常、角膜内への血管の侵入は認められない。Peters異常や強膜化角膜などと異なり、通常は前眼部、後眼部ともに異常所見を伴わない。また、一般に全身的な先天異常や精神発達遅滞を伴わない。

常染色体優性遺伝と劣性遺伝の場合があり、後者では家族歴がはっきりしない(孤発例)ことがある。一般に優性遺伝のCHED1では発症年齢が遅く、混濁の程度が軽い傾向がある^{4,5)}。視力が比較的良好な例はCHED1でみられやすく、逆に劣性遺伝のCHED2では視力予後が不良で、眼振を伴いやすい。

角膜所見は基本的に変化しないか、緩徐に進行する。ただし、成人例では2次的な変化が加わり、spheroid変性や血管侵入を伴ってくることもある。図2は40歳代のCHED1症例の前眼部写真であるが、角膜浮腫に加えて続発性にspheroid変性を生じていることがわかる。

小児の全層角膜移植は手術手技や術後管理に困難な点が多く、予後不良であることが多いが、CHEDに関しては比較的良好な成績が報告されている^{6,7)}。これは、1) 虹彩や水晶体などに異常を伴わないこと、2) 全身合併症や精神発達遅滞などを伴わないこと、3) 発症時期は生後早期であっても、手術は成長してから行っていることが多いこと(大人になって手術を行う場合もある)などが関係しているものと推測される。

術後観察期間が3年程度の2つの報告^{6,7)}では、移植片透明治癒率は90%程度ときわめて高く、視力予後でも0.2以上の視力が66~84%の症例で得られている。

* Masakazu Yamada: 国立病院機構東京医療センター感覚器センター

[別刷請求先] 山田昌和: 〒152-8982 東京都目黒区東が丘2-5-1 国立病院機構東京医療センター感覚器センター



図1 先天性角膜内皮ジストロフィ
角膜上皮、実質に浮腫状混濁がみられるが、優性遺伝の症例であり、混濁の程度は比較的軽い。



図2 先天性角膜内皮ジストロフィ
成人例であり、浮腫状混濁の程度は軽いが、spheroid変性や周辺からの血管侵入など統発性的変化を生じている。

この数字は、成人の角膜ジストロフィに対する全層角膜移植の成績と比較しても極端に劣るものではない。ただし、重症例で乳幼児のうちに手術を行う場合には、周術期の管理の問題と視性刺激遮断弱視の存在があるので、これほどの成績は期待できない。

II 検査所見

1. 病理組織所見

病理組織所見では、Descemet膜の肥厚と角膜内皮細胞の欠如、もしくは著明な減少が特徴とされている^{3,8)}。

角膜上皮には、細胞間隙の拡大や上皮基底細胞下の水疱性変化がみられ、Bowman膜は一部で消失していたり、線維性組織で置換されていることもある。角膜実質は著明に厚みが増しており、ラメラ構造の乱れが著明である。これらは水疱性角膜症で一般的にみられる変化であり、統発性的変化と考えられる。

病理所見として重要なのはDescemet膜と角膜内皮の所見である。Descemet膜の肥厚は劣性遺伝のCHED2で著明であることが多い。また肥厚したDescemet膜のうち内皮側にPAS染色(過ヨウ素酸Schiff染色)で染色されない領域があることも特徴とされている⁹⁾。年齢の高い症例ほどDescemet膜の肥厚が著明であることから、CHEDでの角膜の変化は生後も続いていることが示唆される。

2. 遺伝子検査所見

常染色体優性遺伝のCHED1の責任遺伝子の染色体座位は染色体20番の20p11.2-q11.2の領域にあり⁹⁾、劣性遺伝のCHED2は同じ20番染色体の別の領域(20p13)にマップされ、両者は異なる遺伝子背景をもつことが2000年までに報告されていた¹⁰⁾。

最近、CHED2の責任遺伝子がsolute carrier family 4 (sodium borate transporter) member 11 (SLC4A11)であることが明らかとなり、SLC4A11領域の遺伝子変異が相次いで報告されている^{11,12)}。Sodium borate transporterは細胞内外のイオン輸送に関与する膜蛋白であり、その異常は角膜内皮の主要な機能であるポンプ機能の障害に繋がるものと推測されている。Fuchs角膜内皮ジストロフィの一部でもSLC4A11領域のヘテロの遺伝子変異が報告されており¹³⁾、sodium borate transporterが角膜内皮の機能維持に重要な膜蛋白であることが示唆される。

優性遺伝のCHED1の責任遺伝子は確定されていないが、20p11.2-q11.2の領域は後部多形性角膜内皮ジストロフィがマップされている領域¹⁴⁾とoverlapしており、両者には何らかの関連があることが示唆される。

遺伝子異常からみるとCHED1とCHED2は別疾患であり、CHED1が後部多形性角膜内皮ジストロフィと、CHED2がFuchs角膜内皮ジストロフィとの関連が示唆

表1 先天性角膜内皮ジストロフィ (CHED) の鑑別疾患

	罹患眼	発症時期	他の眼異常	全身異常	遺伝形式
CHED	両眼	生下時	なし	なし	常優, 常劣
先天緑内障	両眼または片眼	生下時～さまざま	高眼圧, 牛眼	伴うことあり	さまざま
Peters 異常	両眼または片眼	生下時	虹彩, 水晶体の異常	Peters plus 症候群	不明が多い
鉗子分娩	片眼	生下時	なし	なし	非遺伝性
梅毒性角膜実質炎	両眼	幼児期以降	網脈絡膜炎 虹彩萎縮, 癒着	Hutchinson 3 徴	非遺伝性
ムコ多糖症	両眼	1-2歳以降	網膜変性 視神経萎縮	ガーゴイル顔貌 全身症状	主に常劣
後部多形性角膜内皮ジストロフィ	両眼	生下時～さまざま	なし	なし	常優
先天性角膜実質ジストロフィ	両眼	生下時	なし	なし	常優

常優：常染色体優性遺伝, 常劣：常染色体劣性遺伝。

されるのは興味深い。他の角膜ジストロフィのように臨床型ではなく、分子遺伝学からの分類がなされ、CHEDの疾患概念が再構成される日が近いのかもしれない。

III 鑑別疾患

鑑別疾患として問題になるものを表1に示す。生下時もしくは乳幼児に両眼性に角膜混濁をきたす疾患が鑑別の対象となる。

先天緑内障では Descemet 膜破裂により浮腫性の角膜混濁をきたすことがあるが、眼圧の上昇、角膜径の増大により鑑別される。ただし、先天緑内障と合併した症例の報告があり、先天緑内障で眼圧が正常化しても角膜浮

腫の軽減がみられない場合には本症の合併を疑う必要がある。Peters 異常や強膜化角膜などの前眼部発生異常は、両眼の所見に左右差がみられることが多いこと、虹彩や隅角、水晶体などの異常所見から鑑別される(図3, 4)。



図3 Peters 異常

角膜混濁が中央に限局しており、虹彩と角膜の不分離と白内障を合併している。

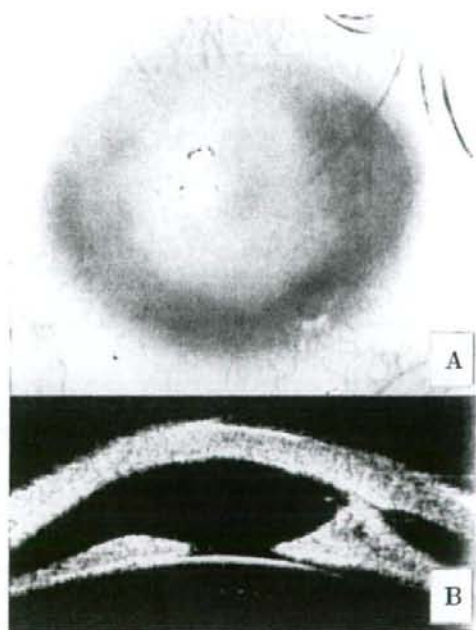


図4 Peters 異常

角膜混濁が広範で両眼性の例では先天性角膜内皮ジストロフィとの鑑別が問題になる(A)が、前眼部エコーで虹彩と角膜の不分離が確認される(B)。

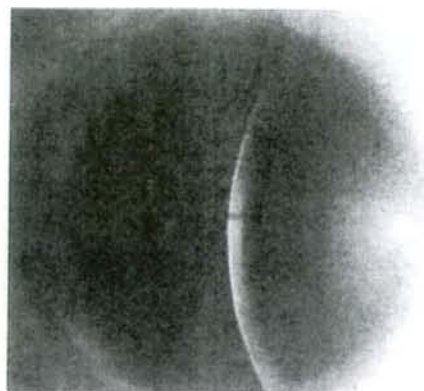


図5 先天性角膜実質ジストロフィ
スリガラス状のびまん性実質混濁は角膜中央部に強く、
実質の厚みは正常である。

鑑別で問題となるのは先天性角膜実質ジストロフィ (congenital hereditary stromal dystrophy: CHSD) であると思われる (図5)。CHSDはきわめてまれな先天性角膜ジストロフィであり、生下時より存在し、非進行性の両眼性の角膜混濁を特徴とする^{15,16)}。スリガラス状のびまん性の混濁は中央部の実質浅層に強く、角膜厚は正常である。常染色体優性遺伝であり、原因遺伝子は特定されていない。実質のコラーゲン線維の形成異常と考えられており、角膜内皮やDescemet膜に異常はない。CHEDと臨床診断されている症例のなかにCHSDが混在している可能性があり、実際、CHEDと臨床診断された症例のなかに病理所見からはCHSDと考えられる症例が報告されている¹⁵⁾。

おわりに

先天性の角膜混濁は10万人の出生に3人の割合といわれ、基本的にはまれな病態である。先天性角膜混濁にはさまざまな原因があり、CHEDはそのうちの一つにすぎないので、一般眼科医が遭遇する機会はなかなかないかもしれない。しかし、最近の知見からは、角膜内皮ジストロフィがCHEDや後部多形性角膜内皮ジストロフィからFuchs角膜内皮ジストロフィまで一連のスペクトラムで整理される可能性があり、その意味も含めて角膜専門医でなくとも知っておきたい疾患と考えられる。

文 献

- 1) Laurence GZ: Corneitis interstitialis in utero. *Klin Monat Augenhelkunde* 1: 351, 1893
- 2) Maumenee AE: Congenital hereditary corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 50: 1114-1124, 1960
- 3) Pearce WG, Tripathi RC, Morgan G: Congenital endothelial corneal dystrophy - clinical, pathological and genetic study. *Br J Ophthalmol* 53: 577-591, 1969
- 4) Kenyon KR, Maumenee AE: Further studies of congenital hereditary endothelial dystrophy of the cornea. *Am J Ophthalmol* 76: 419-439, 1973
- 5) Judisch GF, Maumenee IH: Clinical differentiation of recessive congenital hereditary endothelial dystrophy and dominant hereditary endothelial dystrophy. *Am J Ophthalmol* 85: 606-612, 1978
- 6) Kirkness CM: The corneal endothelial dystrophies. *Ann Acad Med* 18: 158-164, 1989
- 7) Sajjadi H, Javadi MA, Hemmati R et al: Results of penetrating keratoplasty in CHED (congenital hereditary endothelial dystrophy). *Cornea* 14: 18-25, 1995
- 8) Kirkness CM, McCartney A, Rice NS et al: Congenital hereditary corneal oedema of Maumenee: its clinical features, management and pathology. *Br J Ophthalmol* 71: 130-144, 1987
- 9) Toma NMG, Ebenezer ND, Inglehearn CF et al: Linkage of congenital hereditary endothelial dystrophy to chromosome 20. *Human Mol Genet* 4: 2395-2398, 1995
- 10) Callaghan M, Hand CK, Kennedy SM et al: Homozygosity mapping and linkage analysis demonstrate that autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) and autosomal dominant CHED are genetically distinct. *Br J Ophthalmol* 83: 115-119, 1999
- 11) Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P et al: Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nature Genet* 38: 755-757, 2006
- 12) Jiao X, Sultana A, Garg P et al: Autosomal recessive corneal endothelial dystrophy (CHED2) is associated with mutations in SLC4A11. *J Med Genet* 44: 64-68, 2007
- 13) Vithana EN, Morgan P, Ramprasad V et al: SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Human Mol Genet* 17: 655-666, 2008
- 14) Heon E, Mathers WD, Alward WL et al: Linkage of posterior polymorphous corneal dystrophy to 20q11. *Human Mol Genet* 4: 485-488, 1995
- 15) Witschel H, Fine BS, Grütznér P et al: Congenital hereditary stromal dystrophy of the cornea. *Arch Ophthalmol* 96: 1043-1051, 1978
- 16) Ginderdeuren RV, Vos RD, Casteels I et al: Report of a new family with dominant congenital hereditary stromal dystrophy of the cornea. *Cornea* 21: 118-120, 2002

1. 加齢の影響を見極める—加齢による解剖生理的变化と視覚機能の低下

2. 角膜・結膜・前眼部の加齢変化

国立病院機構東京医療センター感覚器センター 山田昌和

はじめに

図1に20歳代の女性と70歳代の女性の前眼部写真を示す。結膜の色素沈着、瞼裂斑、角膜周辺部の老人環などから、たとえ顔を見なくともどちらが高齢者のものか容易に判定できる。人の顔を見ただけで大体の年齢が推定できるように、前眼部にもさまざまなところに年齢の影響が表れるのである¹⁾。

加齢に伴う角結膜の変化は、1) 老廃物、異常物質の蓄積、沈着、2) 慢性の光(紫外線)障害、3) 上皮、上皮組織の変性、退行性変化、4) 角膜内皮の変性、退行性変化の4つに大きく分けることができそうである。この稿ではこの分類を基にして、角結膜の加齢に伴う変化について述べる。

I. 老廃物、異常物質の蓄積、沈着

角結膜の加齢性変化と考えられているものには、老人環、瞼裂斑、Vogt's limbal girdle (type I, type II), iron line, senile furrow, posterior crocodile shagreen, corneal farinata などがあり、加齢に伴う病的変化の代表例には翼状片、帯状角膜変性、滴状角膜、Fuchs角膜内皮ジストロフィなどがある²⁾。

図2に70歳代男性の前眼部写真を示す。この症例では、下方の角膜実質が老人環よりも輪部側の部分で菲薄化しており、senile furrowと呼ばれる所見である。写真ではわかりにくい鼻側の瞼裂斑の角膜寄りの部分には Vogt's limbal gir-

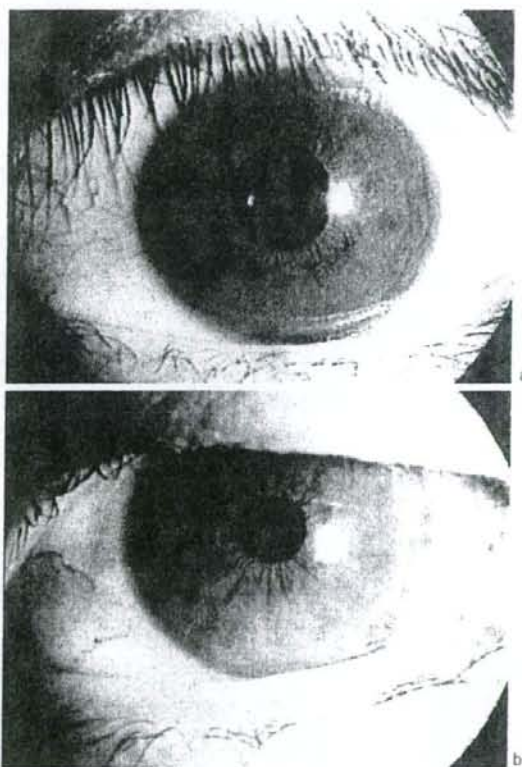


図1 20歳代(a)と70歳代(b)の正常者の前眼部写真
bでは、結膜の色素沈着、瞼裂斑、角膜周辺部の老人環がみられ、前眼部だけで高齢者のものと判定できる。

dle type Iがみられる。Vogt's limbal girdleは3時9時の角膜輪部付近にみられる灰白色の混濁であり、type Iはカルシウム塩の沈着がその本態で、帯状角膜変性の初期段階とみなされている。一方、type IIは上皮下に類弾性線維変性がみら

れ、瞼裂斑や翼状片と共通の病理学的変化を伴っている。1枚の前眼部写真からも眼表面の加齢性変化をあげていくことはむずかしくないことがわかる。

筆者ら³⁾が以前に50歳以上の眼科外来受診者303例を調査した結果では、老人環、瞼裂斑、Vogt's limbal girdle (type I, type II), iron lineの頻度が高く、その多くは加齢とともに頻度が上昇していた(表1)。老人環は角膜周辺部への脂質沈着、Vogt's limbal girdle type Iはカルシウム塩の沈着であり、iron lineは上皮への鉄の沈着である。瞼裂斑とVogt's limbal girdle type IIも変性した異常物質の沈着と捉えることができるので、角膜の加齢性変化の多くは老廃物や異常物質の蓄積によるといえそうである。

II. 慢性の光(紫外線)障害

加齢による角結膜の変化として紫外線暴露の影響を見逃すことはできない。紫外線による角結膜の変化として代表的なのは瞼裂斑、翼状片、スフェロイド変性、扁平上皮癌である。正常な加齢性変化という意味からは瞼裂斑を取り上げるのが適切であろうが、臨床的なエビデンスの豊富さから、ここでは紫外線障害としての翼状片について述べる。

翼状片と紫外線暴露との関連はさまざまな疫学的なデータから証明されている⁴⁾。翼状片の有病率は地域と人種でかなり異なっているが、特に緯度との関連が大きい。緯度の高い北米都市部での翼状片の有病率は1.4%に過ぎないのに対し、オーストラリアでは9.6%、インドネシアでは10.0%とかなり高く、熱帯に属するバルバトス諸島の黒人では23.4%に上る。本邦でも本州と沖縄では翼状片の有病率がかなり異なる。職業別では農業、漁業など屋外の職種や溶接工での有病率が高いことが知られており、このほかの危険因子として、年齢、サングラス不使用などがあげられている。

翼状片と紫外線暴露の関連は明らかとしても、その発症様式には不思議な面がある。翼状片はほとんどの症例で鼻側に生じ、図3のように両側



図2 角結膜の加齢性変化の典型例(70歳代男性)
老人環、senile furrow、瞼裂斑、Vogt's limbal girdle type Iがみられる。

表1 角結膜の加齢性変化の年代別頻度(%)

年代(年齢)	50歳代	60歳代	70歳代	80歳以上
老人環	31.0	70.7	82.2	86.5
瞼裂斑	48.3	56.5	37.6	21.2
Vogt's limbal girdle type I	5.2	6.6	9.9	13.5
Vogt's limbal girdle type II	8.6	18.5	21.8	15.4
iron line	5.2	7.7	11.9	9.6

(文献3)より引用)

に生じるのは2%、耳側に生じるのはわずかに1%と報告されている。この理由として、鼻に反射した光が鼻側結膜に当たるから、睫毛は耳側が長いので耳側は光から保護されるから、などの説があったが、いずれも説得力に欠けていた。また、正面から紫外線暴露を受けやすいとすれば、外斜視の症例では非固視眼に翼状片の発症率が高そうであるが、実際には逆に固視眼に翼状片が生じやすいことが報告されている⁴⁾。

この点に関してはMalooofら⁵⁾の魅力的な仮説がある。翼状片は正面からの紫外線ではなく、側方からの紫外線暴露によって生じるという説である。側方から眼内に入った光は角膜で屈折して図4のように鼻側輪部に集光され、後方14°から入射した場合には最大20倍に集光するという。側方から入った紫外線による障害が鼻側輪部に慢性に持続的に生じた結果、翼状片の発症につながっていくという仮説であり、ほとんどの翼状片が鼻

側に生じること、外斜視の症例で固視眼に翼状片が多いこと、など臨床疫学的事実を矛盾なく説明できる点に魅力がある。

翼状片の危険因子として、幼少時の生育環境(緯度の低い地域に在住する、屋外でよく遊ぶなど)の影響の方が、成人となつてからの環境より大きいという報告がある。Ooiら⁶⁾は結膜の自発蛍光を撮影することで、瞼裂斑をより早期に発見できると報告している。筆者らも試みにブルーフィルターを用いて前眼部を撮影してみたところ、瞼裂斑に一致して自発蛍光がみられることが確認できた(図5)。

驚くべきことに、Ooiら⁶⁾の蛍光撮影装置を用いると12~15歳の小児の81%にすでに瞼裂斑が存在しているというのである。瞼裂斑の自発蛍光による早期発見が可能であることを示すとともに、紫外線障害が小児期から生じていることを示唆するものと考えられる。瞼裂斑が翼状片の発生母地かどうかは議論があるが、紫外線暴露との関連が深いことはよく知られている。

加齢あるいは慢性的紫外線障害による眼表面疾患の代表と考えられている瞼裂斑、翼状片も、その母地は小児期から始まっている可能性がある。瞼裂斑、翼状片の存在は光障害による眼疾患の代表である白内障や黄斑変性ともlinkしている可能性があり、眼の慢性紫外線障害の早期indicatorとしても注目される。

III. 上皮, 上皮組織の変性, 退行性変化

皮膚の加齢性変化の代表として、しわ、しみ、たるみがあげられる。眼瞼では、皮膚、皮下結合組織のたるみは眼瞼皮膚弛緩症、加齢性眼瞼下垂、眼瞼内反症などの原因となるが、眼表面上皮のしわ、たるみが原因となって生じる状態の代表は結膜弛緩症であろうと思われる。

結膜弛緩症は、下方球結膜が弛緩する状態を指し、主に加齢性変化によって生じる(図6)。結膜弛緩症は、決して新しい疾患概念ではなく、高齢者における有病率が高い疾患であるが、長い間、過小評価されてきた疾患の一つである⁷⁾。しかし

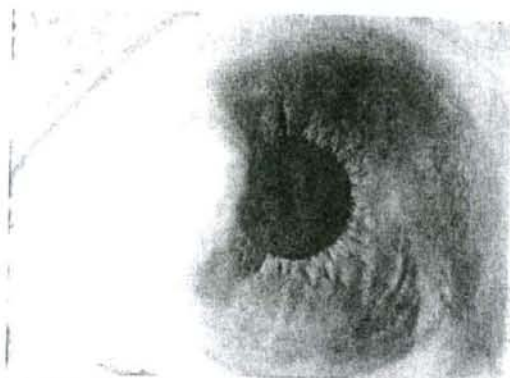


図3 両側の翼状片
翼状片が耳側に生じるのはまれで、ほとんどは鼻側のみに生じる。

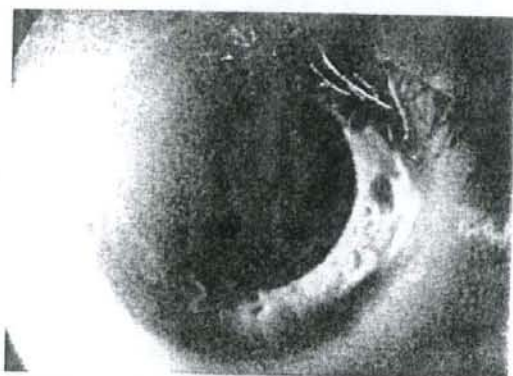


図4 Malloofらの翼状片発症仮説
側方からペンライトで光を当てると、眼内に入った光は鼻側輪部に集光される。

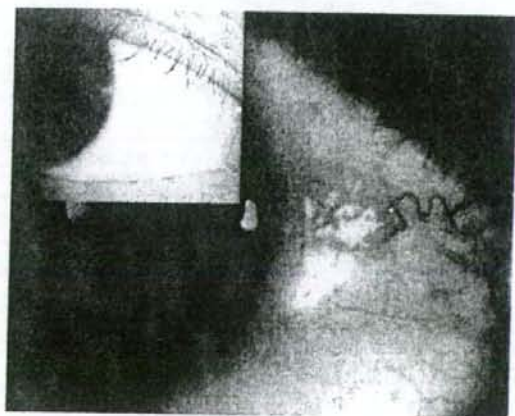


図5 瞼裂斑の自発蛍光
検出条件によっては瞼裂斑の早期発見に有用な可能性がある。

米国で1990年代から流涙あるいはドライアイの原因疾患の一つとして再認識され、本邦でも多彩な自覚症状を呈する高齢者の不定愁訴の原因疾患として注目されるようになってきている⁸⁾。結膜弛緩症の病理所見として、多くの例では異常所見がないとする報告もあるが、弾性線維の断裂やコラーゲン線維の減少、リンパ管拡張などの変性性変化が特徴であるとする報告もある。

結膜弛緩症自体は注意してみると、高齢者の前眼部にしばしばみられる所見であり、全く無症候であることも多い。したがって、結膜弛緩の存在自体は疾患といい難い面もある。問題となるのは、弛緩した球結膜が涙液メニスカス部を占拠するためにメニスカスの機能である涙液の流路障害、分配障害などを生じた場合である。どちらが表に出るかは涙液機能との兼ね合いが大きく、涙液量が保たれている例では流路障害による流涙が、涙液量が減少している例では涙液分配障害による角結膜上皮障害とこれに伴う異物感、眼乾燥感が主症状となる。

もう一つの結膜弛緩の問題は、球結膜と眼瞼の摩擦増大の要因として作用することである。結膜弛緩症のなかには、充血や異物感を主症状とし、球結膜の炎症所見がみられるものがあり、炎症型の結膜弛緩症と呼んで良いかも知れない(図7)。炎症型の結膜弛緩症では、瞬目や眼球運動に伴う球結膜と眼瞼の接触刺激、摩擦抵抗の増大が生じており、これが炎症所見を惹起しているものと推測される。最近、上輪部角結膜炎もこれに類似した病態がベースにあることがわかってきている。

IV. 角膜内皮の変性、退行性変化

角膜内皮は角膜後面を覆う1層の細胞層であり、Descemet膜は角膜内皮の基底膜である。角膜が一定の含水率を保ち、透明性を維持できるのは、内皮細胞のポンプ機能によるところが大きい。

ヒトの角膜内皮は生後、増殖しないことはよく知られている。角膜内皮細胞密度(1mm²当たりの内皮細胞数)には、左右差や性差はないが、人種差があり、白人に比べ日本人の方が細胞密度が

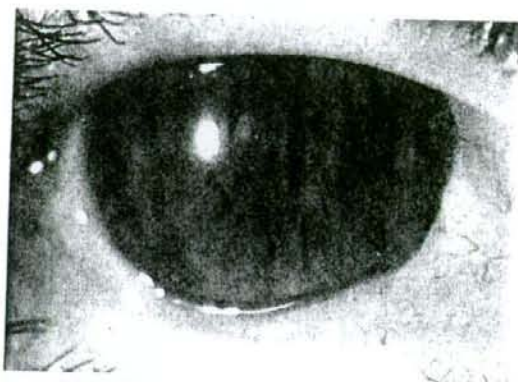


図6 結膜弛緩症
下方球結膜が弛緩した状態で、多彩な自覚症状を呈する一方、無症候であることも多い。

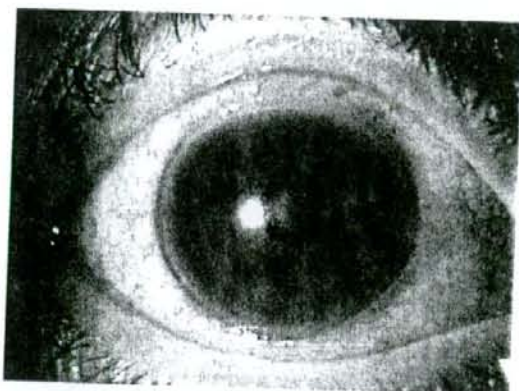


図7 炎症所見の強い結膜弛緩症
結膜充血、浮腫などの炎症所見がみられる。

高い。日本人の内皮細胞密度の正常値は2,780~3,410 cells/mm²であるが、年間0.3~0.7%程度の細胞数減少があるとされており、加齢とともに減少する⁹⁾。したがって正常か否かの判定には常に年齢を考慮する必要がある。

筆者らが白内障術前患者の角膜内皮をスベキュラーマイクロスコープにより検討した結果では、全体の10.7%が角膜内皮減少例(年齢別内皮細胞密度の平均値-2標準偏差を下回る例)と判定され、角膜内皮減少例が少なくないことを示す数字と思われる¹⁰⁾。内皮細胞が減少しやすい要因として、糖尿病、偽落屑症候群、滴状角膜、狭隅角、長期のコンタクトレンズ装着などが知られて