

200906245A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

Fuchs 角膜内皮変性症および  
関連疾患に関する調査研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 坪田 一男

平成 22(2010)年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告	
Fuchs角膜内皮変性症および関連疾患に関する調査研究 .....	1
坪田一男	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	11
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	13

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

Fuchs 角膜内皮変性症および関連疾患に関する調査研究

研究代表者 坪田一男 慶應義塾大学医学部眼科学教室教授

研究要旨：Fuchs 角膜内皮変性症（以下 F 症）は進行性に内皮細胞数の減少をきたし、加齢とともに水疱性角膜症に進行する失明原因疾患である。現在のところ F 症の原因は特定されておらず、視力を回復するには角膜移植手術以外に方法はない。F 症の実態把握と診断基準の作定を目的として、平成 21 年度に本研究参加施設によるレトロスペクティブな臨床調査を行った。その結果、眼科外来受診者計 29,186 例のうち、F 症症例は 31 例で、有病率は 0.11%であった。角膜移植適応症例のうち、内皮機能不全による水疱性角膜症（F 症、移植片機能不全を含む）は全体の 62%をしめ、F 症は全体の 5%を占めた。計 3,298 眼の角膜内皮細胞検査結果から集計した年齢と F 症の各病期の角膜内皮細胞数の関係から、基準線を設けた新たな診断基準の作成を達成できた。

研究分担者氏名・所属研究機関名

及び所属研究機関における職名

坪田一男	慶應義塾大学医学部眼科	教授
榛村重人	慶應義塾大学医学部眼科	准教授
西脇祐司	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学	専任講師
木下 茂	京都府立医科大学眼科	教授
島崎 潤	東京歯科大学眼科	教授
大橋裕一	愛媛大学医学部眼科	教授
杉山和久	金沢大学医学部眼科	教授
天野史郎	東京大学医学部付属病院角膜移植部	准教授

A. 研究目的

Fuchs 角膜内皮変性症（以下 F 症）は原発性に角膜内皮が障害され、進行性に内皮細胞数の減少をきたす疾患である（図 1、2）。正常人でも角膜内皮は老化とともに漸減していき、ヒトの老化を反映する数少ない指標の一つと考えられるが、F 症では内皮細胞数の異常減少とともに

に細胞の形態異常も伴い、進行すると水疱性角膜症となり視力は手動弁ないし光覚弁にまで低下する。現在のところ F 症の原因は特定されておらず、その根本的な治療は開発されておらず、進行をくいとめる治療や予防法も開発されていない。水疱性角膜症に進行すると視力回復には角膜移植以外に方法はなく、水疱性角膜症は角膜移植の最も主要な適応疾患となっているが、本邦の角膜移植の待機患者が約 6,000 名であるのに対し、提供眼球数は年間 1,500 眼程度であり、手術までの長い待機期間があるのが現状である。F 症には民族差があり、白人に多く日本では稀とされるが、現在でも本邦の実態はまだよくわかっておらず、本邦でも欧米でも明確な診断基準が定まっていない。角膜移植適応例の約半数を角膜内皮代償不全による水疱性角膜症が占めるが、そのうちには F 症と診断されず見過ごされている症例が含まれている可能性がある。平成 21 年度における本研究の目的は、本邦での F 症の実態把握と診断基準の作定を目標として、平成 21 年度に本研究



参加施設によるレトロスペクティブな臨床調査を行ったので、その成果を報告する。

## B. 研究方法

平成21年度から、参加施設においてF症のおおよその有病率と実態把握のための臨床調査を開始した。まず、各施設の角膜移植適応症例中のF症の占める割合の集計と、F症の治療成績特に角膜内皮移植によるF症の治療成績をレトロスペクティブに検討し、F症の実態把握を行った。

次に、平成21年度における各施設の眼科外来で角膜内皮細胞検査を受けた全症例のデータを集計し、下記の基準を満たす症例を抽出し、hospital baseでの有病率を測定した。

### F症の診断基準の初期設定

- ①細隙灯顕微鏡検査で滴状角膜を認める。
  - ②スペキュラーマイクロスコーピーで滴状角膜を認める。
- 両眼に①②いずれかの所見を認めるものをF症と判定する。

次に、角膜内皮細胞所見と臨床所見を関連付けた以下の重症度分類を設け、抽出した症例を分類した。

### 重症度分類

I: 単純滴状角膜期、角膜内皮検査で滴状角膜があるが、角膜浮腫がないもの。

II: F 症初期、角膜浮腫がみられ、滴状角膜があるもの。

III: F 症進行期、角膜浮腫がみられ、滴状角膜が高度にあるもの。

この分類で角膜内皮細胞数と年齢との相関を解析することで、新たな診断基準の作成を達成した。

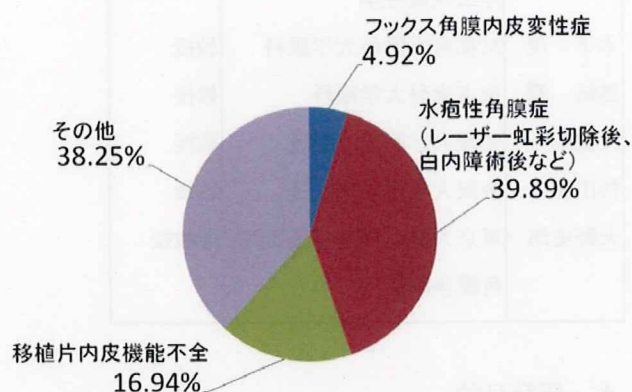
## (倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言（2000年改訂）の趣旨を尊重し、医の倫理に十分に配慮して行った。また、厚生労働省による臨床研究に関する倫理指針（2003年）および疫学研究に関する倫理指針（2007年）にもとづいて研究計画は慶應義塾大学倫理委員会の承認を得た。また、個人を識別できる直接的、間接的な情報については、学会発表、論文を含め一切公表しない。個人情報管理者は研究分担者以外の大学専任教員を任命した。

## C. 研究結果

平成21年度の臨床調査の集計結果から、眼科外来受診者計29,186例のうち、F症症例（上記分類II+III）は31例で、有病率は0.11%であった。角膜移植適応症例のうち、内皮機能不全による水疱性角膜症（F症、移植片機能不全を含む）は全体の62%をしめ、F症は全体の5%を占めた

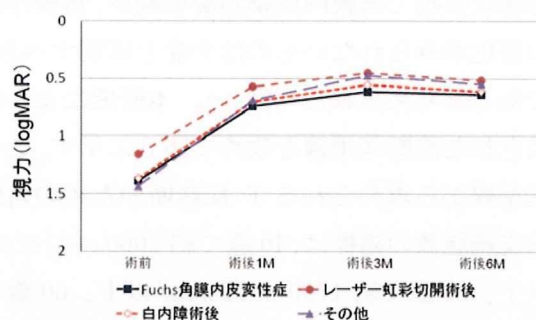
図1 2009年 角膜移植適応症例の内訳



(図1)。

また、手術適応となった17例のF症症例を含む水疱性角膜症の治療成績も検討した。水疱性角膜症の最新の移植法である角膜内皮移植により、F症は他の水疱性角膜症と比較し遜色ない良好な視力回復を達成できることが明らかになった(図2)。

図2 フックス角膜内皮変性症およびその他の疾患における角膜内皮移植術前後の視力の推移



角膜内皮移植では、フックス角膜内皮変性症は他の原因による水疱性角膜症と同程度に良好な術後視力が得られた。

計3,298眼の角膜内皮細胞検査結果から集計した、年齢と各病期の角膜内皮細胞数の関係を図3に示す。

出生時の内皮細胞数を4,000 cells/mm<sup>2</sup>、内皮細胞数減少率を定数-Mと仮定すると次の微分方程式が成立する。

(t: 年齢、N<sub>(t)</sub>: 年齢tでの内皮細胞数)

$$dN_{(t)}/dt = -M \cdot N_{(t)}$$

$$N_{(0)} = 4000$$

この微分方程式の解より、

$$N_{(t)} = 4000e^{(-M \cdot t)}$$

が成立する。このモデルを用いて図3の指数近似曲線から各病期の内皮細胞数減少率(内数字)も計算した。

この図より、「正常(F症なし)(-0.6%)」「滴状角膜があるが角膜浮腫なし(-0.9%)」と、「F症初期(-2.7%)」「F症進行期(-3.1%)」の間に格差が存在した。すなわち「滴状角膜」のままでF症に進行しない疾患群の存在が明らかとなり、これらの群と、角膜浮腫を伴う、あるいは将来角膜浮腫を発症する恐れのある群とを分類する新たな診断基準が必要であることが明らかとなった。そこで、内皮細胞数減少率を-1.7%とした減少曲線をF症の診断基準線と仮定し、これが診断基準として妥当かどうか

の検討も行った。滴状角膜の所見が見られる症例のうち、角膜浮腫を認めない症例(重症度分類I)をF症(-)、角膜浮腫を認める症例(重症度分類II、III)をF症(+)とした臨床上的分類と、新たな基準線による判定結果との関係を表1に示す。この基準線による判定は感度95.5%、特異度83.6%、偽陽性率1.1%であり、診断基準として妥当であることが示された。この表での偽陽性率は44.8%であったが、この中の症例は内皮細胞減少率が-1.7%を超えているので、現在角膜浮腫がみられないが、将来角膜浮腫を生じる可能性のある症例が含まれていると考えられる。すなわち、この診断基準線は、滴状角膜の認められる症例の予後の予測にも有用と考えられた。以上の結果から、F症の診断基準は「両眼性に滴状角膜を認める症例のうち、1眼でも診断基準線を下回る症例をFuchs角膜内皮変性症と診断する。両眼とも診断基準線を上回る症例は無症候性滴状角膜(AGC: Asymptomatic guttata cornea)と診断する。」と結論づけられた。

#### D. 考察

本研究初年度の成果として、29,186例という多数の外来症例数をレトロスペクティブに調査することによって、F症のおおよその有病率を算出できた。本疾患には民族差があり、日本では少ないとされているが、現在まで本邦での実態はよくわかっておらず、有病率にいたっては、本邦はおろか欧米でも正確な値は不明であった。かつてF症は本邦に極めてまれとされてきたが、今回の有病率は0.11%であり、以前に比べ本邦での症例数は増加してきている可能性がある。本研究で有病率を算出でき、F症の実態解明の第一歩を達成できたことは国際的にもアピールできる成果である。

また、本研究で3,298眼という多数の角膜内皮



検査所見をレトロスペクティブに調査することで、基準線を設けた新たな診断基準を作成することができ、これは大きな成果といえる。これほど多数例の角膜内皮検査結果による調査研究は、本邦はおろか国際的にも非常に少ない。滴状角膜とF症の重症度の関係はいままで不明な点が多く、単純滴状角膜がF症の前段階なのか、違う疾患群なのかははっきりしていなかった。今回の結果でF症とは「滴状角膜があり」かつ「角膜浮腫を生じるほど角膜内皮が減少す

る」疾患であることが明らかとなり、「無症候性滴状角膜で角膜内皮細胞数の減少、角膜浮腫の悪化がみられないものはF症と区別すべき」であると考えられた(図4)。本研究により作成された診断基準線を改めて図5に示す。この基準線から求められるF症診断のための角膜内皮細胞数の指標は、40歳で約2000 cells/mm<sup>2</sup>以下、50歳で約1700 cells/mm<sup>2</sup>以下、60歳で約1400 cells/mm<sup>2</sup>以下、70歳で約1200 cells/mm<sup>2</sup>以下である。滴状角膜があってもこ

の基準をみたさない症例は無症候性滴状角膜(AGC)と分類され、これは本研究で得られた新たな疾患概念である。F症の診断基準を明確に作成できたことは学術的・国際的に非常に意義のある結果である。

厚生労働省社会援護局発表の平成18年身体障害児・者実態調査結果によると、本邦の角膜疾患による身体障害者は19,000人である(厚生労働省ホームページより)。一方、本邦の提供眼球数は年間約1500眼程度で全く不足していることを考えると、少ない供給の角膜をいかに適切に患者に提供し、患者の角膜移植治療のニーズに対し答えていくかが喫緊の課題であり、そのためにF症に限らず全ての角膜疾患において重症度分類は大きな社会的意義をもっている。その意味で今回の成果は大きな社会的意義を達成し、また達成しつつあ

図3 計3298眼の角膜内皮細胞密度と年齢の関係

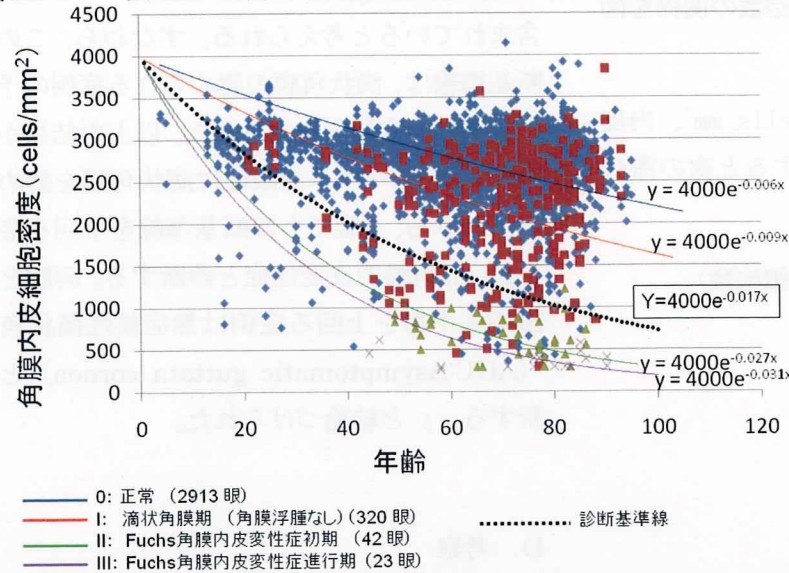


表1 新たな診断基準線によるFuchs角膜内皮変性症(F症)の判定

臨床診断 / 判定	新たな基準線による判定		総計
	F症(+)と判定	F症(-)と判定	
F症(+): 重症度II,III	64	3	67
F症(-): 重症度I	52	266	318
総計	116	269	385

感度 95.5%

特異度 83.6%

偽陰性 1.1%

偽陽性 44.8%

偽陽性のなかにはF症の前段階(pre-Fuchs dystrophy)が含まれている可能性がある。

るといえる。F症の治療については本研究により角膜内皮移植の有効性が示された。今後は角膜内皮移植適応および全層角膜移植適応と相関するように重症度分類の細項目を設定し、重症度分類から手術術式を決定できるように発展させ、最終的な重症度分類を発信し、それにより患者へ適正に角膜移植治療を提供することが、真の治療指針の作成であり、本臨床研究の最終的な到達点である。そのためには角膜内皮細胞数、角膜厚、視力といったパラメーターを重症度分類に加え角膜内皮移植適応や全層角膜移植適応と相関させる作業が必要である。今回のレトロスペクティブな調査結果に加え、

図4 無症候性滴状角膜(AGC)とFuchs角膜内皮変性症は別の疾患群と考えられる。

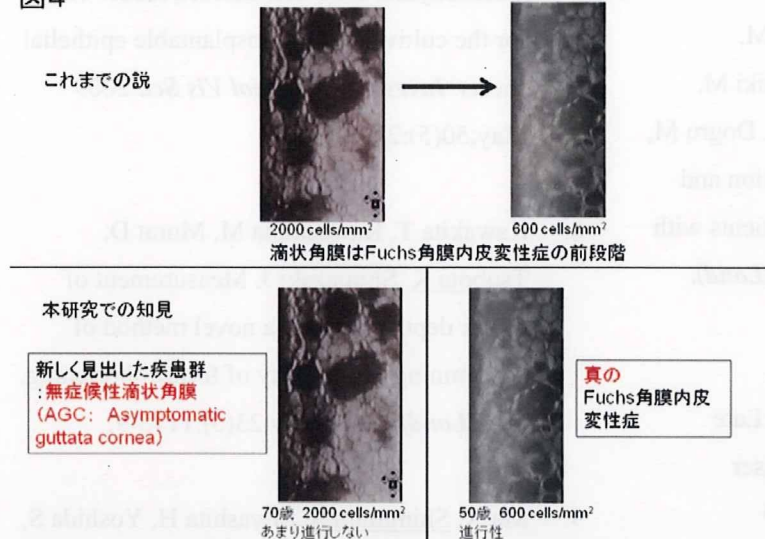
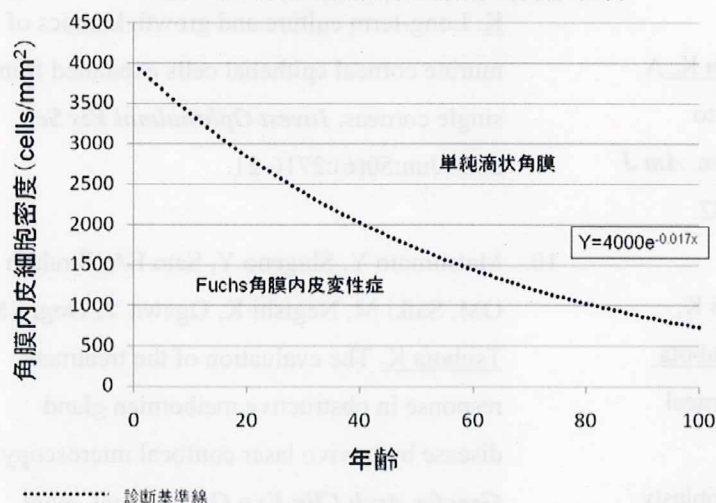


図5 Fuchs角膜内皮変性症診断基準線



現在本研究班はF症を含めた眼科外来受診患者の角膜内皮細胞所見と臨床所見に関するプロスペクティブスタディーが進行中である。これにより得られる結果を重症度分類に反映させることで、信頼できる分類を作成するのが当面の課題であり、それには更なる臨床データの蓄積と統計学的な解析が必要である。

## E. 結論

平成21年度にF症の実態把握と診断基準の作成を目的として本研究参加施設によるレトロスペクティブな臨床調査を行った。その結果、眼

科外来受診者計29,186例のうち、F症症例は31例で、有病率は0.11%であった。角膜移植適応症例のうち、内皮機能不全による水疱性角膜症(F症、移植片機能不全を含む)は全体の62%をしめ、F症は全体の5%を占めた。計3,298眼の角膜内皮細胞検査結果から集計した年齢とF症の各病期の角膜内皮細胞数の関係から、基準線を設けた新たな診断基準の作成を達成でき、この基準線から求めたF症診断のための角膜内皮細胞数の指標は、40歳で約2000 cells/mm<sup>2</sup>以下、50歳で約1700 cells/mm<sup>2</sup>以下、60歳で約1400 cells/mm<sup>2</sup>以下、70歳で約1200 cells/mm<sup>2</sup>以下であった。この基準をみたさない滴状角膜症例は無症候性滴状角膜(AGC)とする新たな疾患概念も確立できた。F症の診断基準を明確に作成できたことは学術的・国際的に非常に意義のある結果である。今後は角膜内皮移植適応および全層角膜移植適応と相関するように重症度分類



の細項目を設定し、重症度分類から手術術式を決定できるように発展させ、最終的な重症度分類を作成することが課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamaguchi T, Dogru M, Yamaguchi K, Ono T, Saiki M, Okuyama H, Tsubota K, Negishi K Effect of spherical aberration on visual function under photopic and mesopic conditions after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Jan;35(1):57-63.
2. Ban Y, Ogawa Y, Goto E, Uchino M, Terauchi N, Seki M, Nakaya M, Saiki M, Mori T, Okamoto S, Matsumoto Y, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K. Tear function and lipid layer alterations in dry eye patients with chronic graft-vs-host disease. *Eye (Lond)*. 2009 Jan;23(1):202-8.
3. Shimazaki J, Uchino Y, Tsubota K Late irreversible corneal oedema after laser iridotomy.. *Br J Ophthalmol*. 2009 Jan;93(1):125-6.
4. Kaido M, Ishida R, Dogru M, Tsubota K. A new punctal plug insertion technique to prevent intracanalicular plug migration. *Am J Ophthalmol*. 2009 Jan;147(1):178-182.
5. Yamaguchi T, Negishi K, Yamaguchi K, Murat D, Uchino Y, Shimmura S, Tsubota K. Effect of anterior and posterior corneal surface irregularity on vision after Descemet-stripping endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Apr;35(4):688-94.
6. Yamaguchi T, Negishi K, Dogru M, Saiki M, Tsubota K Improvement of functional visual acuity after cataract surgery in patients with good pre- and postoperative spectacle-corrected visual acuity.. *J Refract Surg*. 2009 May;25(5):410-5.
7. Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 May;50(5):2109-15.
8. Kawakita T, Kawashima M, Murat D, Tsubota K, Shimazaki J. Measurement of fornix depth and area: a novel method of determining the severity of fornix shortening. *Eye (Lond)*. 2009 May;23(5):1115-9.
9. Ma X, Shimmura S, Miyashita H, Yoshida S, Kubota M, Kawakita T, Tsubota K. Long-term culture and growth kinetics of murine corneal epithelial cells expanded from single corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jun;50(6):2716-21.
10. Matsumoto Y, Shigeno Y, Sato EA, Ibrahim OM, Saiki M, Negishi K, Ogawa Y, Dogru M, Tsubota K. The evaluation of the treatment response in obstructive meibomian gland disease by in vivo laser confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Jun;247(6):821-9.



11. Kawashima M, Kawakita T, Yoshida S, Shimmura S, Tsubota K. Nucleostemin as a possible progenitor marker of corneal epithelial cells. *Mol Vis*. 2009 Jun 10;15:1162-8.
  12. Ishioka M, Kato N, Takano Y, Shimazaki J, Tsubota K. The quantitative detection of blurring of vision after eyedrop instillation using a functional visual acuity system. *Acta Ophthalmol*. 2009 Aug;87(5):574-5.
  13. Yamaguchi T, Negishi K, Ono T, Torii H, Dogru M, Yamaguchi K, Ohnuma K, Tsubota K. Feasibility of spherical aberration correction with aspheric intraocular lenses in cataract surgery based on individual pupil diameter. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Oct;35(10):1725-33.
  14. Shimazaki J, Tsubota K, Tseng SC. Greater growth potential of p63-positive epithelial cell clusters maintained in human limbal epithelial sheets. T, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Oct;50(10):4611-7.
  15. Tsubota K, Nishiyama T, Mishima K, Inoue H, Doi T, Hattori Y, Kodama T, Higuchi A, Hayashi Y, Saito I. The role of fractalkine as an accelerating factor on the autoimmune exocrinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Oct;50(10):4753-60.
  16. Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Kato N, Ogawa Y, Kawakita T, Shimazaki J, Tsubota K. N-cadherin in the maintenance of human corneal limbal epithelial progenitor cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Oct;50(10):4640-5.
  17. Nishimura R, Negishi K, Dogru M, Saiki M, Arai H, Toda I, Yamaguchi T, Tsubota K. Effect of age on changes in anterior chamber depth and volume after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Nov;35(11):1868-72.
  18. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K. Turnover rate of tear-film lipid layer determined by fluorophotometry. *Br J Ophthalmol*. 2009 Nov;93(11):1535-8.
  19. Yaguchi S, Yaguchi S, Noda Y, Taguchi Y, Negishi K, Tsubota K. Foldable acrylic intraocular lens with distended haptics for transscleral fixation. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Dec;35(12):2047-50.
2. 学会発表
    1. Kubota S, Kurihara T, Ishida S, Tsubota K. Resveratrol prevents ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis via inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappa B activation. Gordon Research Conference, Biology of Aging, Ventura, CA, 2009/2/15-20,
    2. Torii H, Negishi K, Dogru M, Yamaguchi T, Kawaguchi N, Saiki M, Tsubota K. A Three-Year Follow-up After LASIK in Eye with Extremely Thin Corneal Bed. American Society of Cataract and Refractive Surgery Symposium & Congress (ASCRS) 2009, San Francisco USA, 2009/4/3-8.

3. Okumura Y, Negishi K, Dogru M, Kawamura R, Yamaguchi T, Toda I, Tsubota K. Pupil block glaucoma after implantation of iris-fixated phakic intraocular lens. American Society of Cataract and Refractive Surgery Symposium & Congress (ASCRS) 2009, San Francisco USA, 2009/4/3-8.
4. Fukui M, Yamaguchi T, Negishi K, Dogru M, Saiki M, Tsubota K. Improvement of functional visual acuity after cataract surgery with good pre- visual acuity after cataract surgery with good pre- and postoperative visual acuity. American Society of Cataract and Refractive Surgery Symposium & Congress (ASCRS) 2009, San Francisco USA, 2009/4/3-8.
5. Kubota M, Shimmura S, Kurihara T, Kubota S, Ishida S, Kawakita T, Tsubota K. Superoxide dismutase-1 regulates corneal neovascularization in mice. The 9th WCI: World Congress on Inflammation, Tokyo, 2009/7/6-7/9
6. Kubota S, Kurihara T, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, Tsubota K.. Resveratrol suppresses ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. Global COE Summer School KEIO-LUND 2009 at Tokyo, Japan, 2009/8/3
7. Negishi K, Kodama C, Yamaguchi T, Torii H, Dogru M, Ohnuma K, Tsubota K. Predictability of the ocular spherical aberration after cataract surgery using the preoperative corneal spherical aberration. The 27<sup>th</sup> European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS). Barcelona, Spain, 2009/9/16.
8. Yamaguchi T, Shimazaki J, Yamaguchi K, Negishi K, Dogru M, Uchino Y, Shimmura S, Tsubota K. Comparison of Anterior and Posterior Corneal Surface Irregularity in Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty and Penetrating Keratoplasty. Japan Korea Joint Conference, Kyoto, 2009/10/16-17
9. 比嘉一成、榛村重人、加藤直子、宮下英之、小川葉子、川北哲也、島崎 潤、坪田一男. 角膜輪部上皮未分化細胞の維持と N-cadherin. 3 回角膜カンファレンス 大阪 2009/2/19-2/21
10. 川北哲也、榛村重人、比嘉一成、島崎 潤、坪田一男. 角膜輪部に存在する p63 陽性細胞塊はステムセルリッチな集団か？ 3 回角膜カンファレンス 大阪 2009/2/19-2/21
11. 岡田直子、榛村重人、川北哲也、川島素子、美島健二、齋藤一郎、坪田一男. 角膜上皮細胞の増殖に対する酸化ストレスと Clusterin の影響 3 回角膜カンファレンス 大阪 2009/2/19-2/21
12. 内野裕一、榛村重人、羽藤 晋、松本幸裕、川北哲也、坪田一男. DSAEK と PKP の術後角膜厚および実質混濁の比較 3 回角膜カンファレンス 大阪 2009/2/19-2/21
13. 比嘉一成、榛村重人、加藤直子、宮下英之、小川葉子、川北哲也、島崎 潤、坪田一男. 角膜輪部ニッチモデルにおける



- N-cadherin の角膜上皮未分化の維持 第 8 回日本再生医療学会総会、東京、2009/3/5-6
14. 大本雅弘、宮下英之、比嘉一成、坪田一男、榛村重人. ヒト骨髄間葉系幹細胞のフィーダー細胞としての有用性 第 8 回日本再生医療学会総会、東京、2009/3/5-6
  15. 久保田みゆき, 栗原俊英, 久保田俊介, 臼井智彦, 石田晋, 榛村重人, 坪田一男. SOD1 による角膜血管新生の制御 第 113 回日本眼科学会 東京 2009/04/16-19
  16. Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. 第 7 回幹細胞シンポジウム 東京 2009/5/15-5/16.
  17. 尾関直毅, 谷口紗織, 結城賢弥, 芝大介, 榛村重人, 坪田一男. 緑内障への角膜内皮移植術の検討第 20 回緑内障学会 沖縄 2009/11/13-15
  18. 川北哲也、再生医療の展望とアンチエイジング. 第 57 回細胞検査士教育セミナー 東京、2009/8/22
  19. 榛村重人、角膜疾患に対する再生医学第 88 回慶応義塾大学生涯教育研修セミナー、東京、2009/06/13
  20. 榛村重人、最新の角膜手術第 2 回眼科臨床クイックレビュー、大阪、2009/10/31
  21. 坪田一男. 特別講演 「アンチエイジング医学のサイエンス」. 第 4 回大阪皮膚アンチエイジング研究会 大阪 2009/10/15.
  22. 坪田一男. レクチャー5「サイエンスアップデート 2009」 抗加齢医学の実際 2009 東京、2009/9/20-21.
  23. 坪田一男. ランチョンセミナー アンチエイジングの新展開 第 37 回日本臨床免疫学会総会 東京、2009/11/13-15
  24. 坪田一男. 酸化ストレス、重金属と眼科疾患 第 5 回キレーションセミナー 東京、2009/11/15
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)  
特になし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akira Kobayashi, Hideaki Yokogawa, Kazuhisa Sugiyama	In Vivo Laser Confocal Microscopy after Non-Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty.*	Ophthalmology,	116,(7)	1306-1313	2009
Takefumi Yamaguchi, Kazuno Negishi, Kazuko Yamaguchi, Dogru Murat, Yuichi Uchino, Shigeto Shimmura, Kazuo Tsubota	Effect of anterior and posterior corneal surface irregularity on vision after Descemet-stripping endothelial keratoplasty.*	J Cataract Refract Surg	35	688-694	2009
市橋慶之, 富田真智子, 島崎潤	角膜内皮移植術の短期治療成績.*	日眼会誌	113	721-726.	2009
Kawashima M, Kawakita T, Yoshida S, Shimmura S, Tsubota K	Nucleostemin as a possible progenitor marker of corneal epithelial cells.	Mol Vis	15	1162-1168	2009
Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Kato N, Ogawa Y, Kawakita T, Shimazaki J, Tsubota K	N-cadherin in the maintenance of human corneal limbal epithelial progenitor cells in vitro.	Invest Ophthalmol Vis Sci	50	4640-4645	2009
Yamaguchi T, Negishi K, Ono T, Torii H, Dogru M, Yamaguchi K, Ohnuma K, Tsubota K.	Feasibility of spherical aberration correction with aspheric intraocular lenses in cataract surgery based on individual pupil diameter.	J Cataract Refract Surg	35(10)	1725-33	2009
Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K.	Turnover rate of tear-film lipid layer determined by fluorophotometry.	Br J Ophthalmol.	93(11)	1535-8.	2009
Kawakita T, Shimmura S, Higa K, Espana EM, He H, Shimazaki J, Tsubota K, T seng SC	Greater growth potential of p63-positive epithelial cell clusters maintained in human limbal epithelial sheets.	Invest Ophthalmol Vis Sci	50(10)	4611-7.	2009

Toda I, Yoshida A, Sakai C, Hori-Komai Y, Tsubota K.	Visual performance after reduced blurring in eyes with soft contact lenses or after LASIK.	J Refract Surg	25(1):	69-73.	2009
Ma X, Shimmura S, Miyashita H, Yoshida S, Kubota M, Kawakita T, Tsubota K.	Long-term culture and growth kinetics of murine corneal epithelial cells expanded from single corneas.	Invest Ophthalmol Vis Sci	50(6)	2716-21.	2009
Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K.	The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets.	Invest Ophthalmol Vis Sci	50(5)	2109-15.	2009

\*巻末に添付。



## 研究成果の刊行物・別刷

# In Vivo Laser Confocal Microscopy after Non-Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty

Akira Kobayashi, MD, PhD, Hideaki Yokogawa, MD, Kazuhisa Sugiyama, MD, PhD

**Objective:** To investigate in vivo corneal changes in patients with bullous keratopathy who underwent non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK) with the use of laser confocal microscopy.

**Design:** Single-center, prospective clinical study.

**Participants:** Ten eyes (10 patients; 3 men and 7 women; mean age,  $73.5 \pm 6.6$  years [mean  $\pm$  standard deviation]) with bullous keratopathy were evaluated in this study.

**Testing:** In vivo laser confocal microscopy was performed before and 1, 3, and 6 months after nDSAEK.

**Main Outcome Measures:** Selected confocal images of corneal layers were evaluated qualitatively and quantitatively for degree of haze and density of deposits.

**Results:** Before surgery, the following were observed in all patients: corneal epithelial edema, subepithelial haze, keratocytes in a honeycomb pattern, and tiny needle-shaped materials in the stroma. After nDSAEK, subepithelial haze, donor-recipient interface haze, and interface particles were observed in all measurable cases; postoperative haze, interface particles, and needle-shaped materials decreased statistically significantly ( $P < 0.05$ ) over the course of follow-up. In addition, hyperreflective giant interface particles were observed after nDSAEK in all patients.

**Conclusions:** In vivo laser confocal microscopy can identify subclinical corneal abnormalities after nDSAEK such as subepithelial haze, host-recipient interface haze, host stromal needle-shaped materials, and host-recipient interface particles with characteristic giant particles. Further studies with this technology in a large number of patients and long-term follow-up are needed to understand fully the long-term corneal stromal changes after nDSAEK.

**Financial Disclosure(s):** The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article. *Ophthalmology* 2009;116:1306-1313 © 2009 by the American Academy of Ophthalmology.



Over the past several years, new surgical techniques have been reported for treatment of bullous keratopathy that replace only the dysfunctional posterior portion of the cornea through a scleral pocket incision.<sup>1-5</sup> Most notably, these techniques completely eliminate surface corneal incisions or sutures, maintain much of the cornea's structural integrity, and induce minimal refractive change, suggesting distinct advantages over standard penetrating keratoplasty. Recently, preparation of donor tissue in endothelial keratoplasty has been made easier with use of an automated microkeratome, and the addition of this component to the surgical procedure has been popularized as Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK).<sup>4,6</sup> Recently, the authors<sup>7</sup> and other investigators<sup>8,9</sup> eliminated Descemet's stripping for non-Fuchs'-type bullous keratopathies and called the modified procedure non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK).<sup>7</sup> Both nDSAEK and DSAEK have proved quite effective for endothelial dysfunction without guttata, with rapid visual recovery and minimal induced astigmatism.<sup>7</sup>

In vivo white-light confocal microscopy has been used for real-time, noninvasive in vivo observation of normal and pathologic corneal microstructures at the cellular level.<sup>10-12</sup> Recently, a new-generation in vivo laser confocal microscopy device (Heidelberg Retina Tomograph 2 Rostock Cornea Module; Heidelberg Engineering GmbH, Dossenheim, Germany) has become available.<sup>13-15</sup> This device provides high-definition histologic-like images of corneal microstructures in vivo with an axial resolution of nearly  $4 \mu\text{m}$  (see Heidelberg Retina Tomograph 2 [Rostock Cornea Module] Operating Instructions of Software version 1.1), much better than that obtained with a conventional white-light confocal microscope (for instance,  $10 \mu\text{m}$  in axial optical resolution with ConfoScan 2 [Nidek Technologies, Vigonza, Italy]; see ConfoScan 2 operator's manual). The authors recently published an initial report of in vivo laser confocal microscopic findings before and after DSAEK.<sup>16</sup> This article reports for the first time in vivo laser confocal microscopic characteristics of the cornea with bullous keratopathy before and after nDSAEK.



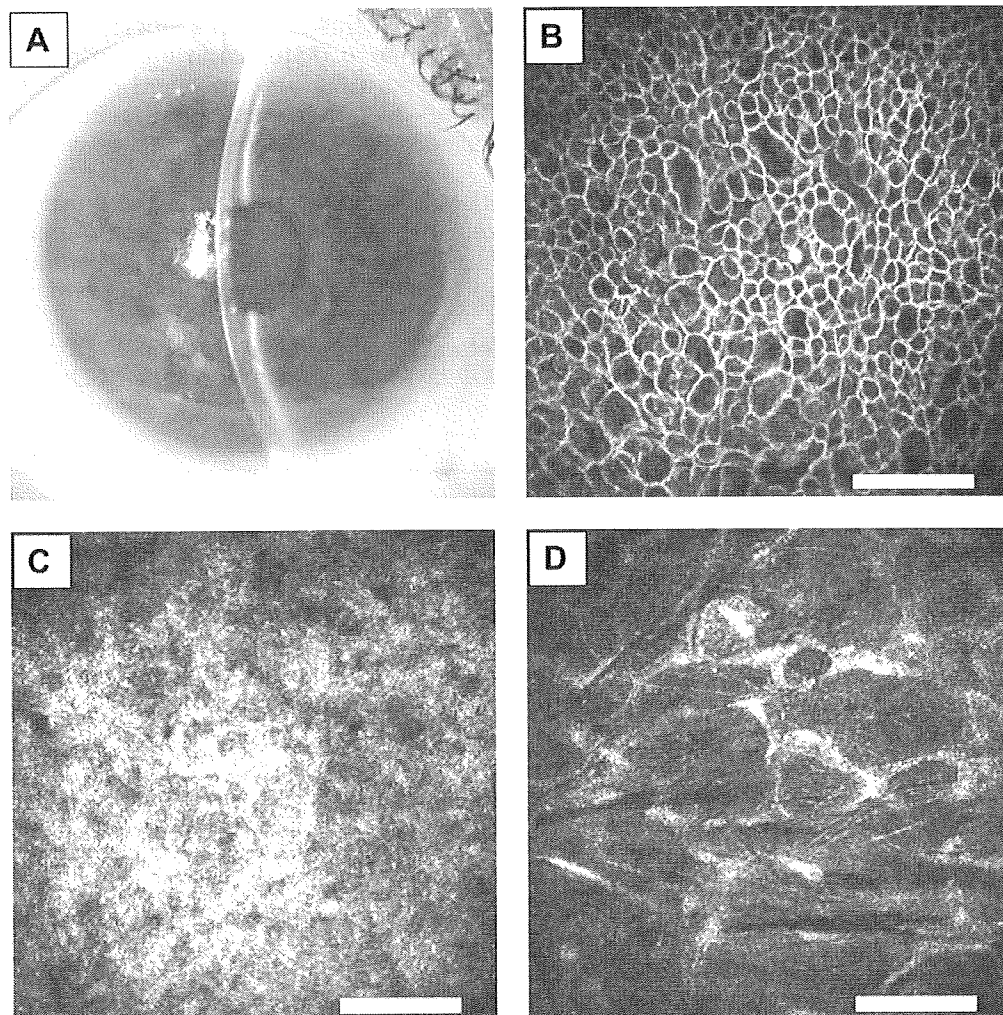
## Patients and Methods

The study was approved by the Ethical Committee of Kanazawa University Graduate School of Medical Science and followed the tenets of the Declaration of Helsinki. Table 1 summarizes the demographic data of the 10 patients (3 men, 7 women; mean age,  $73.5 \pm 6.6$  years [mean  $\pm$  standard deviation (SD)]) with bullous keratopathy who enrolled in this study; simultaneous cataract surgery was performed for 6 cases. Nine patients had undergone previous argon laser iridotomy for angle-closure glaucoma attack (Fig 1A); in the remaining patient, bullous keratopathy developed after endophthalmitis. All nDSAEK surgeries were performed using general anesthesia from July 2007 through January 2008 by a single surgeon (AK) at the Department of Ophthalmology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science. All patients read and signed an informed consent document before enrollment.

## Surgical Procedure

All nDSAEK procedures were performed as previously described.<sup>7</sup> In brief, donor tissue was dissected with a microkeratome (ALTK Cbm;

Moria Japan KK, Tokyo, Japan) equipped with a 300- $\mu$ m head. After microkeratome dissection, donor tissue was transferred to a punching system and cut with an 8.0-mm diameter punch (Barron donor cornea punch; Katena Products, Inc, Denville, NJ). For patients with cataract and endothelial failure (cases 2–7), phacoemulsification and intraocular lens insertion were performed through a temporal clear corneal incision just before the nDSAEK procedure. Neither scoring of the Descemet's membrane in a circular pattern nor Descemet's membrane stripping were performed for any patient (making all procedures nDSAEK). Then, inferior iridectomy at the 6-o'clock position was created using a 25-gauge vitreous cutter (MIDLAB, San Leandro, CA). For cases 1 to 7 and 10, donor endothelial lamella was inserted into the anterior chamber with pull-through technique using double glides: the IOL implantation sheet glide (model GLDE10; Alcon Laboratories, Inc, Fort Worth, TX) and Busin glide (catalog no. 19098; Moria, Antony, France; Kobayashi double glide technique,<sup>7,17</sup> as shown in Video 1, available at <http://aaojournal.org>). For cases 8 and 9, donor endothelial lamella was inserted into the anterior chamber with the pull-through technique using a Monarch B cartridge (Alcon Laboratories, Inc), as shown in Video 2 (available at [http://aoojournal.org](http://aaojournal.org)). After securing the wound with interrupted 10-0 nylon suture, air was injected to attach the donor lamella to the posterior



**Figure 1.** Representative slit-lamp biomicroscopic photograph and in vivo laser confocal images obtained for case 8 before non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK). **A**, Slit-lamp preprocedure photograph of the right cornea showing bullous keratopathy after argon laser iridotomy. **B**, Before surgery, basal epithelial cells were swollen and disorganized because of bullous change. **C**, Subepithelial stromal haze (grade 3) was observed. **D**, Keratocytes in a honeycomb pattern with numerous tiny needle-shaped materials in the stroma were observed. Bar = 100  $\mu$ m (original magnification,  $\times 300$ ).

Table 1. Demographic Data and Clinical Outcomes of the

Case No.	Gender	Age (yrs)	Eye	Surgery	Clinical Diagnosis	Complications
1	F	66	Left	nDSAEK	BK after ALI	Iris prolapse during donor insertion
2	M	71	Right	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	None
3	F	83	Left	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	Donor dislocation requiring rebubbling
4	F	74	Left	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	Subclinical rejection (POD26)
5	F	67	Right	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	None
6	F	76	Right	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	None
7	M	76	Right	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	None
8	F	63	Right	nDSAEK+PEA+IOL	BK after ALI	None
9	M	78	Left	nDSAEK	Endotheliitis	None
10	F	81	Left	nDSAEK	BK after ALI	None

ALI = argon laser iridotomy; BK = bullous keratopathy; D = diopters; F = female; IOL = intraocular lens implantation; M = male; nDSAEK = \*Unmeasurable because of severe bullous keratopathy.

stromal surface. Corneal massage was performed in all cases to eliminate residual fluid at the recipient-donor interface. No corneal fenestrations were made to drain interface fluid. No recipient peripheral stromal scraping was performed to improve donor recipient adhesion. The anterior chamber was left full of air and the patient was instructed to lie on his or her back for 6 to 8 hours.

### In Vivo Laser Confocal Microscopy with the Heidelberg Retina Tomograph 2 Rostock Cornea Module

Before enrollment, written informed consent was obtained from all subjects after explaining the nature and possible consequences of this study, such as superficial punctate keratopathy. In vivo laser confocal microscopy was performed before and 1, 3, and 6 months after nDSAEK for each patient. However, preoperative confocal data were not available for cases 7 and 9. The microscopy technique was as follows: after applying a large drop of contact gel (Comfort Gel ophthalmic ointment; Bausch & Lomb/Storz, Heidelberg, Germany) on the front surface of the microscope lens and ensuring no air bubbles had formed, a Tomo-cap (Heidelberg Engineering GmbH) was mounted on the holder to cover the microscope lens. The central cornea was examined layer by layer. The HRT2 RCM uses a 60× water-immersion objective lens (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany) and a 670-nm diode laser as the light source; the observation area was 400×400  $\mu\text{m}$ . Two examinations per eye were performed.

Corneal subepithelial haze and donor-recipient interface haze observed before and after nDSAEK were graded from 0 to 3 based on the severity of the haze: grade 0, no haze; grade 1, mild haze; grade 2, moderate haze; grade 3, severe haze.<sup>7</sup> Statistical analysis was performed using the trend test based on Mantel-Haenszel methods. However, because of the unavailability of preoperative data for cases 7 and 9, subepithelial haze grading scores and stromal needle-shaped body densities for these cases were not included in statistical analysis. Donor-recipient interface particle densities and deep stromal needle-shaped bodies were measured using software built into the HRT2 RCM (Heidelberg eye explorer version 1.4.1.0 cornea section cell count; Heidelberg Engineering GmbH); this software calculates densities of manually defined objects in confocal images. Also, statistical analysis was performed using the trend test based on Mantel-Haenszel methods. Probability val-

ues less than 0.05 were considered to be significant. To ensure consistency, images were analyzed retrospectively by a single investigator (AK) who was masked to clinical features.

## Results

### Clinical Outcomes

All 10 patients (100%) reached better than 20/32 best-corrected visual acuity within 6 months after nDSAEK (Fig 2A). Four patients (40.0%) reached better than 20/20 visual acuity, and 1 patient (10.0%) reached 20/16 visual acuity within 6 months. Within 1 year, 7 patients (70.0%) reached more than 20/20 visual acuity, and 2 patients (20.0%) reached 20/16 visual acuity. Mean induced astigmatism  $\pm$  SD in measurable cases at 6 months after surgery was  $0.67 \pm 0.45$  diopters (D; range, 0.25–1.5 D). Postoperative endothelial cell counts after 6 months ranged from 1589 to 3095 cells/ $\text{mm}^2$  (mean  $\pm$  SD,  $2229.4 \pm 501.0$  cells/ $\text{mm}^2$ ), a 26.5% reduction compared with donor counts (mean  $\pm$  SD,  $3034.5 \pm 356.9$  cells/ $\text{mm}^2$ ).

### In Vivo Laser Confocal Microscopy

There was no apparent examination variability between 2 examinations on the same eye. The following were observed consistently before surgery: corneal epithelial edema (Fig 1B), subepithelial haze (Fig 1C), and keratocytes forming a honeycomb pattern (Fig 1D). Highly reflective tiny needle-shaped materials also were observed in the middle to deep corneal stroma in all measurable cases (cases 1–4, 6, and 8), suggesting pathologic changes resulting from bullous keratopathy (Fig 1D). Preoperative data were not available for cases 7 and 9. At 1, 3, and 6 months after nDSAEK, the following were observed for all patients: normal epithelium (Fig 2A–B), subbasal nerves (Fig 2C), subepithelial haze (Fig 2D), and normal keratocyte nuclei in the mid stroma (Fig 2E). The donor cornea was characterized as having normal, nonactivated keratocytes (Fig 2G). However, host corneal stroma was easily distinguishable by HRT2 RCM based on the presence of numerous highly reflective tiny needlelike materials (Fig 2E). Donor endothelium was observed by HRT2 RCM in all cases (Fig 2H). No apparent inflammatory cells, including polymorphonuclear leukocytes or Langerhans cells, were observed in or around the donor-recipient interface, as well as in host or donor corneal stroma.

Numerous highly reflective particles were observed consistently at the level of the donor-recipient interface (Fig 2F). Most of the

## 10 Patients with Bullous Keratopathy Enrolled in This Study

Donor Insertion Technique	Initial Best-Corrected Visual Acuity (Manifest Refraction)	Best-Corrected Visual Acuity (Manifest Refraction) 6 Months after Surgery	Endothelial Cell Density (/mm <sup>2</sup> ) before Surgery/6 Months after Surgery (Cell Loss Rate %)
Pull-through (Busin glide)	20/40 (−3.5 D cylinder−0.5 D×40)	20/20 (−3.25 D)	3455/1966 (42.2)
Pull-through (double glide)	20/63 (−6.0 D)	20/25 (cylinder −1.0 D×90)	3072/2898 (5.7)
Pull-through (double glide)	20/40 (0.5 D cylinder−1.75 D×88)	20/32 (−1.0 D cylinder−1.5 D×90)	2582/1964 (23.9)
Pull-through (double glide)	20/32 (−3.5 D)	20/20 (−0.5 D cylinder 1.0 D×55)	3273/2433 (25.7)
Pull-through (double glide)	Hand movements (*unmeasurable)	20/32 (−2.5 D cylinder−0.5 D×90)	2889/1701 (41.1)
Pull-through (double glide)	20/63 (−12.0 D cylinder−2.0 D×90)	20/25 (−3.5 D cylinder−1.0 D×10)	2823/1589 (43.7)
Pull-through (double glide)	20/25 (0.5 D cylinder −1.75 D×115)	20/20 (−0.75 D cylinder−0.25 D×90)	3016/2570 (14.8)
Pull-through (cartridge)	20/63 (+2.5 D cylinder −2.0 D×79)	20/16 (−0.5 D cylinder−1.5 D×50)	2849/2066 (27.5)
Pull-through (cartridge)	Hand movements (*unmeasurable)	20/20 (−1.5 D cylinder−1.0 D×70)	3720/3095 (16.8)
Pull-through (double glide)	20/400 (+1.5−1.5×55)	20/25 (2.5 D cylinder−2.25 D×45)	2666/2008 (24.7)

non–Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty; PEA = phacoemulsification and aspiration.

particles were smaller than 10  $\mu\text{m}$ ; however, highly reflective giant particles of more than 20  $\mu\text{m}$  were observed sporadically in all cases (Fig 3A–D). These giant particles were irregularly shaped and sometimes accompanied artifactlike reflections. The observed mean densities $\pm$ SD of interface particles for all 10 patients at 1, 3, and 6 months after surgery were  $232.8\pm 76.2$  particles/mm<sup>2</sup> (range, 102.0–308.5 particles/mm<sup>2</sup>),  $189.2\pm 60.1$  particles/mm<sup>2</sup> (range, 94.7–245.0 particles/mm<sup>2</sup>), and  $152.8\pm 41.2$  particles/mm<sup>2</sup> (range, 106.0–230.0 particles/mm<sup>2</sup>), respectively. There was a highly statistically significant association between time and decrease of interface particle density ( $P = 0.002$ ; Fig 4).

For subepithelial stromal haze, the observed scores (mean scores $\pm$ SD) before surgery and at 1, 3, and 6 months after surgery were  $2.8\pm 0.5$ ,  $2.0\pm 0.5$ ,  $1.8\pm 0.5$ , and  $1.4\pm 0.5$ , respectively, a significant linear association between time and decrease of haze ( $P<0.001$ ; Fig 5). For donor–recipient interface haze, the observed scores (mean scores $\pm$ SD) at 1, 3, and 6 months after surgery were  $2.0\pm 0$ ,  $1.4\pm 0.5$ , and  $1.0\pm 0$ , respectively, again, a statistically significant association between time and decrease of haze ( $P<0.001$ ; Fig 6). Collectively, both subepithelial and interface haze decreased over the follow-up; however, haze persisted at 6 months after surgery.

The observed mean densities $\pm$ SD of highly reflective tiny needle-shaped materials in the middle to deep corneal stroma before surgery and at 1, 3, and 6 months after surgery were  $100.9\pm 51.9$  materials/mm<sup>2</sup> (range, 55.1–200.1 materials/mm<sup>2</sup>),  $100.5\pm 44.1$  materials/mm<sup>2</sup> (range, 48.4–170.5 materials/mm<sup>2</sup>),  $79.6\pm 36.9$  materials/mm<sup>2</sup> (range, 37.4–146.8 materials/mm<sup>2</sup>), and  $59.4\pm 16.7$  materials/mm<sup>2</sup> (range, 29.3–139.0 materials/mm<sup>2</sup>), respectively, a highly statistically significant association between time and decrease of needle-shaped material density ( $P = 0.013$ ; Fig 7).

## Discussion

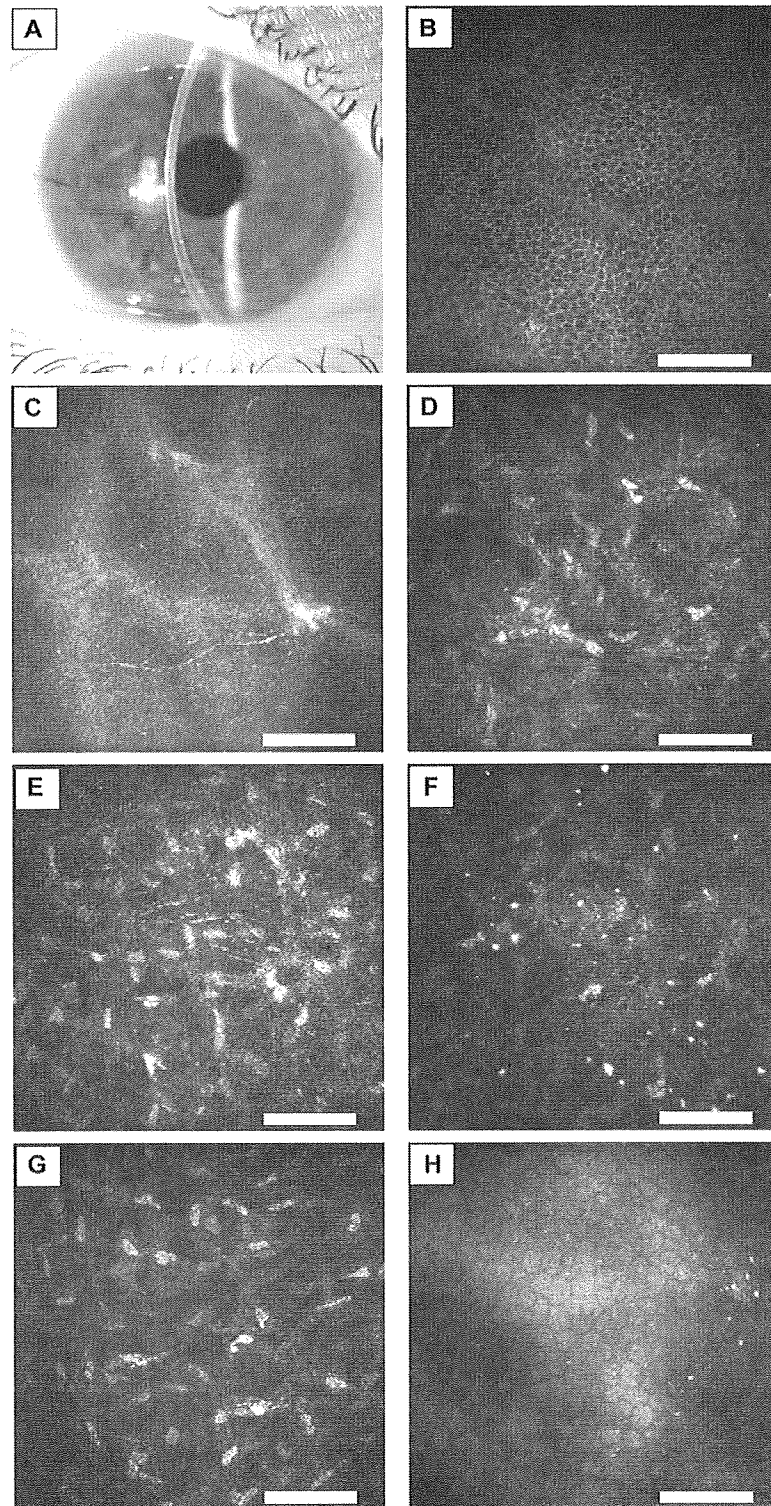
Herein are reported prospective, qualitative, and quantitative evaluations with in vivo laser confocal microscopy of 10 corneas with bullous keratopathies treated with nDSAEK. As a result, characteristic in vivo cellular and corneal stromal changes were identified that occur in the first 6 months of postoperative follow-up. These findings may contribute new knowledge about the wound-healing process that takes place at

the interface between recipient cornea with nonstripped Descemet's membrane or endothelium and donor endothelial graft.

Recently, the authors reported that numerous highly reflective particles of varying size (mostly less than 10  $\mu\text{m}$ ) were observed consistently after DSAEK at the level of the donor–recipient interface as observed by in vivo laser confocal microscopy.<sup>16</sup> Similarly, in the current study, highly reflective particles of varying size were observed consistently at the level of the donor–recipient interface after nDSAEK. As is the case with DSAEK, mean density of particles after nDSAEK decreased over the postoperative study period from 232.8 particles/mm<sup>2</sup> (after 1 month) to 152.8 particles/mm<sup>2</sup> (after 6 months), a statistically significant difference ( $P = 0.002$ ). Similar, highly reflective particles commonly can be observed at the level of flap interface after LASIK.<sup>18</sup> Multiple origins have been proposed for the particles observed after LASIK, including metal particles from the microkeratome blade, meibomian gland secretions, activated keratocytes, cellular debris, and plastic.<sup>19–21</sup> Although particle images appear to be similar, the causes of particles observed in the DSAEK<sup>16</sup> or nDSAEK interface may be different from those observed after LASIK. One notable difference between donor–recipient interface particles after nDSAEK and particles after DSAEK is the presence of hyperreflective giant particles with a size of more than 30  $\mu\text{m}$  (Fig 3). The only histologic difference of the cornea after nDSAEK compared with that after DSAEK is the presence of Descemet's membrane and compressed, possibly necrotic, host endothelial cells. Therefore, the authors hypothesize that the hyperreflective giant particles observed after nDSAEK may be necrotic and aggregated host endothelial cells.

As is the case with DSAEK,<sup>16</sup> subepithelial stromal haze and donor–recipient interface haze persisted after nDSAEK in this study, a finding that is not certain by conventional slit-lamp biomicroscopy. In this study, subepithelial haze decreased over the follow-up period with statistical significance ( $P<0.001$ ); mean subepithelial haze grading de-





**Figure 2.** Representative slit-lamp biomicroscopic photograph and in vivo laser confocal images obtained after the procedure for case 8. **A**, Slit-lamp photograph of the right cornea showing that the epithelial and stromal edema disappeared and the cornea became crystal clear. Spectacle-corrected visual acuity improved from 20/63 to 20/16. **B**, In vivo laser confocal microscopy showed a normal basal epithelial cell layer with compact organized cells 6 months after surgery. **C**, At the level of Bowman's layer, a subbasal nerve was observed. **D**, Subepithelial stromal haze (grade 1) with some highly granular reflectivities persisted after the procedure. **E**, In the mid stroma, normal keratocyte nuclei with numerous tiny needle-shaped materials were observed. **F**, At the level of the donor-recipient interface, highly reflective particles and persistence of mild haze (grade 1) were observed. **G**, In donor stroma, numerous normal nonactivated keratocyte nuclei were observed. **H**, Donor endothelium also was observed. Bar = 100  $\mu$ m (original magnification,  $\times 300$ ).