### 平成 27 年度 学内グラント終了時報告書

# 角膜クロスリンキング後の角膜混濁と境界線発生メカニズム

研究代表者 加藤 直子 (大学病院 眼科)

#### 緒言

円錐角膜は、先天性進行性の角膜疾患であり、角膜 の脆弱性を特徴とする.その多くは、思春期から青年 期に発症し、角膜中心から傍中心部が眼圧に圧され て前方突出、菲薄化する.角膜形状が円錐状に突出し 対称性が失われることにより、近視性乱視の増加と 不正乱視の増加が生じ、裸眼視力、矯正視力が低下する. 視力矯正は、初期には眼鏡により可能であるが、疾患が 進行すると不正乱視の増加により眼鏡では矯正不可能に なり、ハードコンタクトレンズによる矯正が必要になる. さらに進行すると、ハードコンタクトレンズの装用が困難 になり、角膜移植の適応となる.

円錐角膜の原因は不明で、長らくコンタクトレンズ と角膜移植以外の治療法はないとされていた.しかし、 2003年にWollensakらにより角膜クロスリンキングが報告 された<sup>1)</sup>. 角膜クロスリンキングは、リボフラビンと長 波長紫外線を用いて角膜実質のコラーゲン線維間の架橋 結合を増加させ角膜全体の剛性を上げることにより眼圧 により角膜が前方突出するのを防ぐ効果があり、円錐角膜 の進行を停止させる治療である1-3).角膜クロスリンキング は安全性の高い手術だが、術後1~6ヶ月頃にかけて施術 を行った角膜実質に淡いびまん性の混濁が生じることが 知られている<sup>4,5)</sup>.また、びまん性混濁の最も深い層に、 混濁していない実質との境界線がみられることが報告 されている<sup>6</sup>. この境界線の病態については未だ明らかには されていないが、角膜実質のコラーゲンが架橋されている 部位とされていない部位の目安として用いられることが 多い.びまん性混濁と境界線は、多くの症例では視機能には 影響を与えず、術後半年以降になると自然に消退して行く ことが多い.しかし、時にこの境界線が際立ったような 角膜実質深層の強い混濁を生じることもある<sup>7,8)</sup>.

角膜クロスリンキング後のびまん性実質混濁,境界線, そして強い実質深層混濁の病態,発生機序については, 未だ明らかにされていない.本研究では,角膜クロスリン キング後の角膜実質の混濁について,特に,境界線の深さ について,紫外線照射の強度を変えた2種類の角膜クロス リンキングの間で比較検討を行った.

### 対象と方法

対象は、進行性の円錐角膜53例70眼で、円錐角膜が 進行しているという判断は、間を空けて2回以上の検査 を行い、直前の2年以内に自覚視力検査における等価 球面度数が1.0 D以上増加、自覚乱視同数が1.0 D以上 増加、角膜形状解析検査における強主経線上の角膜屈折 力が1.0 D以上増加のいずれかを満たすものとした.また、 角膜クロスリンキングでの紫外線照射開始時に、角膜厚が 400 µm以上確保できることも条件にした.

角膜クロスリンキングは、連携研究施設である東京歯科 大学市川総合病院にて、倫理委員会の承認を受けてから、 以下の手技にて行った. 点眼麻酔の後, 角膜中央部の 上皮を約7.5 mm径で掻爬し、0.1%リボフラビン点眼液 (Medio-cross isotonic, Peschke, Gemaryま た は、VibeX rapid, Avedro, USA)を2分置きに10~15回点眼した. 点眼 終了後に超音波角膜厚測定装置 (SP-100, Tomey, Japan) を用いて角膜中央部から最薄部付近の角膜厚を測定し, 400 µmに達していない場合には0.1%リボフラビン低浸透 圧液 (Medi-cross, hopotonic, Peschke) または注射用蒸留水 を点眼して角膜実質を膨化させた.再度角膜厚を測定し, 400 μmに達したことを確認した後<sup>9,10)</sup>, 370 nmの長波長 紫外線を3.0 mW/cm<sup>2</sup>で30分間, または18.0 mW/cm<sup>2</sup>で 5分間照射した (CCL Vario, Peschke またはKXL System Avedro). 照射後は、ソフトコンタクトレンズを装用し 手術を終了した。

術後、3~5日で上皮欠損が治癒した時点でソフトコン タクトレンズ装用は中止した.ベタメタゾンリン酸エス テルナトリウム0.1%、レボフロキサシン点眼1日4回を 1~2週間処方し、その後は、フルオロメトロン0.1%点眼 を1日4回で処方し、約1ヶ月で漸減中止した.術後診察は、 1週間、1か月、3か月、6か月、1年目に、通常の眼科学的 検査に加えて、角膜内皮細胞数検査、角膜形状解析検査 (CASIA, Tomey, Japan)を行った.

境界線の有無,深さについては,角膜形状解析検査に 撮影された断層像を用いて検討し,角膜上皮表面から 境界線までの距離を深さとした.

### 結果

紫外線照射の条件により,3.0 mW/cm<sup>2</sup>で30分間紫外線 照射したものを通常照射群,18.0 mW/cm<sup>2</sup>で5分間照射した ものを高速照射群とした.通常照射群は16眼,高速照射群 は54眼だった.術前の各群の症例のプロファイルは表1に 示す.

術後は、視力、屈折度数、強主経線上の角膜屈折力、 内皮細胞密度、角膜厚には、両群とも術前と有意差は なく、また群間にも有意差はみられなかった(図1-5). 術後1か月で、通常照射群では全例で境界線が観察 されたが、高速照射群では観察されなかった症例が 3眼みられた(p=0.3112).また、境界線の深さについては、 通常照射群では269.4 ± 56.4 μmで、高速照射群で有意に 浅かった(図6;p<0.0001).

### 考察

角膜クロスリンキングでは、リボフラビンが長波長紫外 線照射により励起されて、周辺の酸素分子から発生した

表1.角膜クロスリンキングを受けた症例の内訳

ー重項酸素の作用でコラーゲン線維が架橋されると考え られている.紫外線のエネルギー量は,強度と照射時間の 積で表されるため,理論上は強度を強くすれば照射時間 を短縮しても同じ効果が得られるはずである.実際に, ドレスデン法と呼ばれる通常照射(3.0 mW/cm<sup>2</sup>×30分)と 9.0 mW/cm<sup>2</sup>×10分の高速照射で同等の結果が得られたと する報告がある<sup>11)</sup>.

著者らは、先に、18.0 mW/cm<sup>2</sup>×5分の照射で術後1年 までの円錐角膜の進行抑制効果を検討したことがあるが、 その際には、視力、屈折度数、角膜屈折力、角膜内皮細胞数、 角膜厚などには有意な変化はみられず、進行予防効果は 通常照射と同等であり、さらに、通常照射と比べて実質 のびまん性混濁が有意に少ないという結果が得られた<sup>12)</sup>. 今回の研究結果で、短時間照射群で通常群に比べて境界線 の深さが浅かったことは、先行研究での、実質のびまん性 混濁が少なかった結果とも関連する可能性が考えられる.

角膜クロスリンキング後の実質混濁と境界線の発生 メカニズムについては、未だに明らかにされていない. 角膜実質の共焦点顕微鏡観察では、角膜クロスリンキング の後は角膜実質細胞が一時的にアポトーシスに陥って

	通常照射群 (3.0 mW/cm2×30分)	高速照射群 (18.0 mW/cm2×5分)	P值
眼数	16眼	54眼	
年齢	18.1 ± 4.3(歳)	23.1 ± 6.7(歳)	
性別	男性 :女性	男性 :女性	
アトピー性皮膚炎の 有無	8眼(38%)	11眼(20%)	
術前最高矯正視力 (LogMAR)	$0.28 \pm 0.28$	$0.33 \pm 0.38$	
術前自覚屈折度数	$-6.2 \pm 4.6 \text{ D}$	-6.6 ± 5.5 D	
術前強主経線上角膜 屈折力	57.5 ± 5.9 D	56.6 ± 7.9 D	
術前角膜厚	$419.1 \pm 47.5 \ \mu m$	$399.5 \pm 55.6 \ \mu m$	
術前角膜内皮細胞数	2940.9 ± 332.9 個/mm <sup>2</sup>	2832.0 ± 361.6 個/mm <sup>2</sup>	



図1.角膜クロスリンキング後の最高矯正視力の変化.角膜 クロスリンキング後の矯正視力は、通常照射群、高速照射 群共に有意な変化はなく、また両群間に有意差もみられ なかった。



図2.角膜クロスリンキング後の自覚屈折度数の変化.角膜 クロスリンキング後の自覚屈折度数(等価球面度数)は、 通常照射群、高速照射群共に有意な変化はなく、また両群 間に有意差もみられなかった。



図3.角膜クロスリンキング後の強主経線上の角膜屈折力の変化. 角膜クロスリンキング後の強主経線上の角膜屈折力は, 通常照射群,高速照射群共に有意な変化はなく,また両群 間に有意差もみられなかった.



図 5. 角膜クロスリンキング後の最薄部角膜厚の変化. 角膜 クロスリンキング後の最薄部角膜厚は,通常照射群,高速 照射群共に有意な変化はなく,また両群間に有意差も みられなかった.

消失し,術後3~6か月かけて再生することが報告され ている.実質混濁や境界線が出現する時期は,実質細胞が 消失している時期にほぼ一致し,角膜実質細胞が再増殖 する時期に一致して消退する.この時,実質細胞が完全に 消失する実質浅層から中層にかけて混濁が現れ,架橋効果 が現弱する深層に境界線が現れることは興味深い.これに ついて,著者らは,角膜実質細胞は実質の細胞外基質の ターンオーバーに寄与しており,実質細胞が消失する時期 には古い細胞外基質が分解されずに残るために浅層から 中層にかけてはびまん性の混濁が生じ,深層では紫外線 強度が弱まるためアポトーシスに陥るには不十分なエネ ルギーを照射されることにより,逆に何らかのシグナル 伝達系が活性化され,細胞外基質の異常産生が起きるの ではないかと考えている.

これを検証するために、今後、動物実験等を行い、境界 線付近の細胞外基質の質的な変化や、培養角膜実質細胞に 対して紫外線照射を行った際の細胞外基質産生の変化に ついて検討することが今後の課題である。



図 4. 角膜クロスリンキング後の内皮細胞数の変化. 角膜クロス リンキング後の内皮細胞数は,通常照射群,高速照射群 共に有意な変化はなく,また両群間に有意差もみられ なかった.



図 6. 角膜クロスリンキング後の境界線の深さ. 角膜クロス リンキング1か月後に境界線がみられた症例での境界線 の深さは、通常照射群に比べて高速照射群共で有意に 浅かった (p<0.0001).

#### 参考文献

- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultravioleta-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. Am J Ophthalmol 2003; 135(5): 620-7.
- Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. J Cataract Refract Surg 2008; 34(5): 796-801.
- Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. J Refract Surg 2008; 24(7): S720-5.
- Dhawan S, Rao K, and Natrajan S. Complications of corneal collagen cross-linking. J Ophthalmol 2011; 1-5.
- 5) Greenstein SA, Fry KL, Bhatt J, Hersh PS. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking

for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. J Cataract Refract Surg 2010; 36(12): 2105-14.

- 6) Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. Cornea 2006; 25(9): 1057-9.
- Vinciguerra P, Albè E, Romano MR, Sabato L, Trazza S. Stromal Opacity After Cross-linking. J Refract Surg 2012; 28(3): 165.
- Kato N, Konomi K, Saiki M, Negishi K, Takeuchi M, Shimazaki J, Tsubota K. Deep stromal opacity after corneal cross-linking. Cornea 2013; 32 (7): 895-8.
- Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. J Cataract Refract Surg 2009; 35(4): 621-4.
- Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, Raiskup F. Corneal cross-linking and safety issues. Open Ophthalmol J 2011 Feb 11; 5: 14-6.
- 11) Kymionisa, GD, Tsoulnarasa KI, Grentzelosa MA, Liakopoulosa DA, Tsakalisa NG, Blazakia SV,

Paraskevopoulosa TA, Tsilimbarisa MK. Evaluation of corneal stromal demarcation line depth following standard and a modified-accelerated collagen cross-linking protocol. Am J Ophthalmol 2014; 158 (4): 671-5.

12) Kato N, Negishi K, Kawakita T, Saiki M, Takeuchi M, Tsubota K. Comparison of the results of accelerated corneal crosslinking and conventional crosslinking; Preliminary results. IX International Congress of Corneal Crosslinking 12/6-7/2-14, Ireland

# 研究成果リスト

## 学会発表

- <u>加藤直子</u>,新澤 恵,葛西 梢,許斐健二,島崎 潤. 角膜クロスリンキング後の内皮細胞減少率,2016角膜 カンファランス,平成28年2月18-20日,長野
- <u>Kato N</u>, Shinzawa M, Kasai K, Konomi K, Shimazaki J. Corneal endothelial loss after corneal crosslinking for keratoconus, ARVO meeting 2016, 2016/05/1-5, Seattle, USA