

Peters 奇形 2 例の組織化学

尾関 年則¹⁾, 白井正一郎¹⁾, 池田 晃三¹⁾, 馬嶋 昭生¹⁾, 平林 義章²⁾, 山田 和順²⁾名古屋市立大学医学部眼科学教室¹⁾, 名古屋市立大学医学部第二解剖学教室²⁾

要 約

Peters 奇形 2 例の角膜実質および強膜のグリコサミノグリカン分子種を組織化学的に検討した。パラフィン切片にヘマトキシリン・エオジン染色あるいは酵素消化法を併用した増感高鉄ジアミン染色を施し、染色した各切片を光学顕微鏡で観察した。組織学的には、角膜中央部で角膜内皮、デスメ膜および実質の一部が欠損し、実質内に崩壊した水晶体成分が観察された。角膜周辺部では未分化な虹彩が角膜後面に癒着し、2 例とも水晶体胞分離不全により成立した Peters 奇形と診断した。ヘマトキシリン・エオジン染色では、強膜は正常の構造であった。

組織化学的に、2 例とも角膜実質にはほぼ同量のコンドロイチン硫酸 A/C および B が存在し、強膜には多量のコンドロイチン硫酸 A/C と少量の B が存在したが、角膜実質、強膜ともケラタン硫酸は検出されなかった。Peters 奇形では角膜実質のみでなく、強膜にもグリコサミノグリカン分子種の異常があることが証明された。(日眼会誌 100 : 471-477, 1996)

キーワード : Peters 奇形, グリコサミノグリカン, 組織化学, 角膜, 強膜

Histochemical Studies on Two Cases of Peters' Anomaly

Hironori Ozeki¹⁾, Shoichiro Shirai¹⁾, Kozo Ikeda¹⁾, Akio Majima¹⁾, Yoshifumi Hirabayashi²⁾ and Kazuyori Yamada²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School²⁾2nd Department of Anatomy, Nagoya City University Medical School

Abstract

We examined glycosaminoglycan molecular species in the corneal stroma and the sclera histochemically in two cases of Peters' anomaly. Paraffin-embedded sections were stained with either hematoxylin-eosin or sensitized high iron diamine combined with enzyme digestion and then examined with a light microscope. In the center of the cornea, the histological specimens revealed defects of the corneal endothelium and Descemet's membrane, together with a local defect of the corneal stroma. Disorganized lens materials were detected in the corneal stroma. In the peripheral cornea, the undifferentiated iris adhered to the corneal posterior surface. Based upon the findings mentioned above, these two cases were diagnosed as having Peters' anomaly caused by faulty separation of the

lens vesicle. The sclera showed normal structures in the specimen stained with hematoxylin-eosin. In both cases, the corneal stroma involved nearly equal amounts of chondroitin sulfate A/C and B. The sclera, on the other hand, contained a large amount of chondroitin sulfate A/C and a relatively small amount of chondroitin sulfate B. Keratan sulfate was never detected in either the cornea or the sclera. Thus, disorders of glycosaminoglycan molecular species were detected in the sclera as well as in the corneal stroma. (J Jpn Ophthalmol Soc 100 : 471-477, 1996)

Key words : Peters' anomaly, Glycosaminoglycan, Histochemistry, Cornea, Sclera

I 緒 言

1906 年, Peters¹⁾によって初めて報告されたことから

命名された Peters 奇形は、先天的に角膜内皮、デスメ膜および実質の一部が欠損し角膜混濁を生じる疾患である。角膜内皮、デスメ膜および実質は発生学的に頭部神経

別刷請求先 : 467 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 尾関 年則
(平成7年12月5日受付, 平成8年2月7日改訂受理)

Reprint requests to : Hironori Ozeki, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School,
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan

(Received December 5, 1995 and accepted in revised form February 7, 1996)

堤細胞由来の組織であり²⁾, Peters 奇形は神経堤細胞の遊走不全により成立する前眼部間葉異発生の一つである^{3)~5)}.

この神経堤細胞の遊走・分化に、酸性複合糖質であるグリコサミノグリカン(glycosaminoglycan, GAG)分子種が関与していること^{6)~8)}が明らかにされており、筆者ら⁹⁾¹⁰⁾は種々の眼先天異常の成立過程におけるGAG分子種の役割を検討してきた。

今回は、Peters 奇形2例2眼の角膜実質および強膜に含まれるGAG分子種を組織化学的に検討し、発生学的考察を加えて報告する。

II 対象および方法

1. 対象

症例1: 生後1週(男), 在胎期間38週, 出生体重2,400g. 左心低形成症候群のため新生児集中治療室に入院中, 出生時から左眼角膜混濁があるため1992年8月20日当科へ紹介された. 初診時, 左眼角膜は前方へ突出し, びまん性に混濁して, 前房は形成されていなかった. 右眼の7時の虹彩実質にわずかな白色組織が観察された. 眼圧は右眼16mmHg, 左眼は角膜の突出のため測定不能であったが, 指圧による計測では右眼と同程度であった. 角膜径は右眼10.0mm×10.0mm, 左眼12.0mm×12.0mm, 左眼Peters奇形による前部ぶどう腫, 右眼虹彩実質過形成と診断した. 全身異常は, 心奇形以外に低位耳介, 高口蓋, 停留睪丸がみられた. 染色体は46, XYで正常核型であった. 左眼の前部ぶどう腫が進行したため(図1a), 生後3週に止むなく左眼球を摘出した. 摘出眼球は前眼部が拡張してひょうたん型を呈し, 眼球の長径は18.0mmであった.

症例2: 生後1日の乳児(男), 在胎期間39週, 出生体重2,180g, 出生時から両眼角膜混濁があり, 1993年7月21日当科を受診した. 初診時, 右眼は角膜中央部が円盤状に混濁して, 虹彩索状物が角膜後面に癒着していたが, 前房はわずかに形成されていた. 左眼は角膜が前方へ突出し, びまん性に混濁して, 前房は形成されていなかった. 眼圧は右眼18mmHg, 左眼19mmHg, 角膜径は右眼8.0mm×8.0mm, 左眼9.5mm×9.5mm, 眼軸長は右眼16.1mm, 左眼18.7mmで, 右眼Peters奇形, 左眼は同奇形による前部ぶどう腫と診断した. 全身異常の合併はなく, 染色体は46, XYで正常核型であった. 左眼の前部ぶどう腫が進行したため(図1b), 生後4週に止むなく左眼球を摘出した. 摘出眼球は前眼部が拡張してひょうたん型を呈し, 眼球の長径は19.0mmであった.

2. 方法

摘出眼球を2.5% グルタルアルデヒド・5.0% ホルマリン混合液(pH 7.2, 0.15Mリン酸塩緩衝液)に室温で15時間固定し, 上昇エタノール列で脱水, キシレンで透徹してパラフィンに包埋後, 厚さ2.0 μ mの連続切片

を作製した.

1) 一般染色法: ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin-eosin, HE)染色

脱パラフィン, 水和した切片をヘマトキシリン液に室温で5~10分間浸漬したのち, 水洗し, 続いて0.5%エオジン液に室温で5~10分間浸漬, 上昇エタノール列で脱水, キシレンで透徹し, 合成封入剤Harleco synthetic resin(HSR)液(国際試薬)で封入した.

2) 硫酸基検出法: 増感高鉄ジアミン(sensitized high iron diamine, S-HID)染色^{11)~13)}

脱パラフィン, 水和した切片を高鉄ジアミン液に25~30°Cで60分間浸漬したのち, 0.5mMトリクロロ(エチレン)白金酸カリウム溶液に20°Cで60分間浸漬した. 同切片を水素化ホウ素ナトリウム液で還元し, 物理現像を行ったのち, 水洗してエタノール系列で脱水, キシレンで透徹し, HSR液で封入した.

3) 酵素消化法

i) コンドロイチナーゼB(chondroitinase B, Chase B)/睪丸ヒアルロニダーゼ(testicular hyaluronidase, T-Hylase)二重消化法¹³⁾

水和した連続切片を3枚(切片①, ②および③)作製し, 切片①は対照切片として, 0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に30°Cで22時間浸漬したのち, 0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 5.5)に37°Cで22時間浸漬した. 切片②は0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)1.0mlにChase B(Flavobacterium heparinum)(生化学工業)を0.15単位溶解した酵素消化液に30°Cで22時間浸漬したのち, 0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 5.5)に37°Cで22時間浸漬した. 切片③は切片②と同条件下のChase B消化後, 0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 5.5)1.0mlにT-Hylase(bovine testis, type VIII)(Sigma Chem Co, St Louis)を1.0mg溶解した酵素消化液に37°Cで22時間浸漬した.

ii) ケラタナーゼ(keratanase, Kase)消化法¹⁴⁾

水和した連続切片を2枚(切片④および⑤)作製し, 切片④は対照切片として, 0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に37°Cで22時間浸漬した. 切片⑤は同緩衝液1.0mlにKase(Pseudomonas属)(生化学工業)を2.5単位溶解した酵素消化液に切片④と同条件下で浸漬した.

4) 観察法¹³⁾¹⁴⁾

HE染色あるいはS-HID染色を施した各切片の角膜および後極部強膜を光学顕微鏡で観察した. Chase B/T-Hylase二重消化法では, 切片①と比較して切片②はコンドロイチン硫酸B由来のS-HID染色性が減弱し, 切片②と比較して切片③はコンドロイチン硫酸A/C由来のS-HID染色性が減弱するため, 各切片を比較することによりコンドロイチン硫酸BおよびA/Cの局在と相対量を判定した. Kase消化法では, 切片④と比較して切片⑤はケラタン硫酸由来のS-HID染色性が減弱するため, 切片④と⑤を比較することによりケラタン硫酸の局

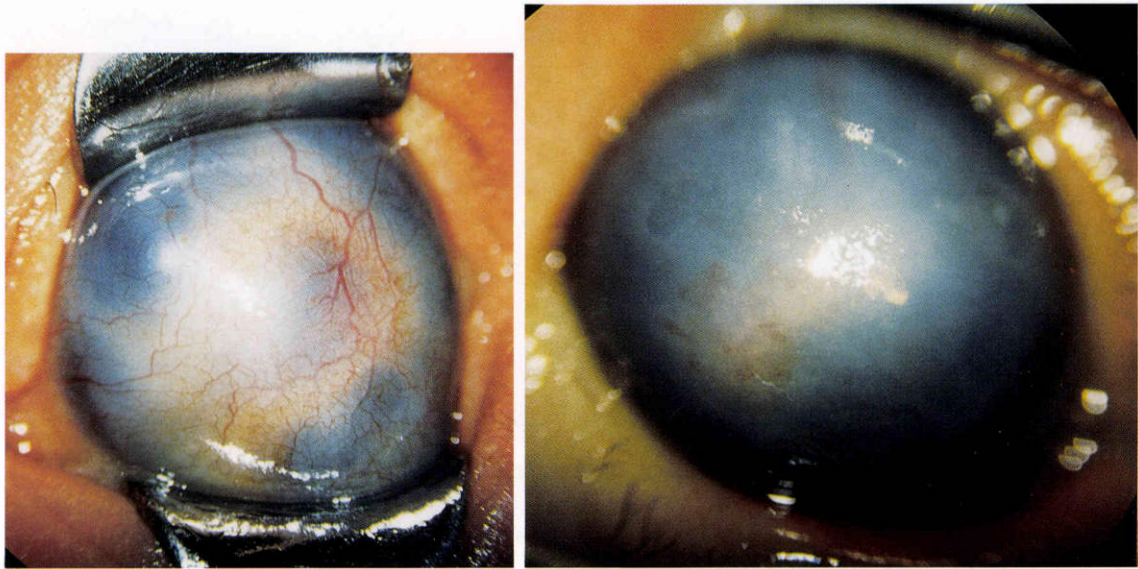


図1 摘出直前の前眼部写真(a: 症例1, b: 症例2)。

2例とも角膜は前方に突出してびまん性に混濁し、角膜への血管侵入も著しい。また、前房はなく、角膜が菲薄化した部位ではぶどう膜と考えられる褐色組織が透見される。

在と量を判定した。

III 結 果

HE染色では、2眼とも角膜中央部で内皮、デスメ膜および実質の一部が欠損し、実質内には崩壊した水晶体成分が存在していた。また、角膜周辺部では未分化な虹彩組織が角膜後面に癒着し、前房は存在しなかった(図2 a, b)。以上の組織学的所見から、いずれも水晶体胞分離不全により成立した Peters 奇形と診断した。強膜は2眼とも、HE染色による光学顕微鏡的観察では正常の構造を示していた(図3 a, b)。

S-HID染色性では、角膜実質は2眼ともに Chase B および T-Hylase 消化に中等度の感受性を示し、Chase B/T-Hylase 二重消化を施すと、角膜実質の S-HID 染色性はほぼ消失した(図4 a~c および 5 a~c)。また、角膜実質は2眼とも Kase 消化に対する感受性はなかった(図6 a, b および 7 a, b)。2眼の強膜はいずれも Chase B 消化に中等度、T-Hylase 消化に強度の感受性を示し、Chase B/T-Hylase 二重消化の後、強膜の S-HID 染色性はほぼ消失した(図8 a~c および 9 a~c)。また、2眼とも強膜は Kase 消化に対する感受性はなかった(図10 a, b および 11 a, b)。

以上の組織化学的所見から、角膜実質には、ほぼ同量のコンドロイチン硫酸 A/C および B が存在したが、ケラタン硫酸は検出されなかった。強膜には、多量のコンドロイチン硫酸 A/C と少量の B が存在したが、ケラタン硫酸は検出されなかった。

IV 考 按

ヒト眼球の正常発生では、角膜実質の主要 GAG 分子

種は胎生 10 か月まではコンドロイチン硫酸で、それ以後はケラタン硫酸であるとされている¹⁵⁾。今回の2眼では、生後にもかかわらず、角膜実質にケラタン硫酸は検出されず、コンドロイチン硫酸 A/C および B が存在していたことから、GAG 分子種の組成の面から Peters 奇形の角膜の未熟性が証明された。角膜実質の GAG はコラーゲンとともに実質細胞自身から産生されること¹⁶⁾が知られており、同奇形では、角膜実質細胞が産生する GAG 分子種の組成が、生後に至るまで正常とは異なっていることが明らかになった。角膜実質の GAG 分子種はコラーゲン線維の配列を調整することによって角膜の透明性に関与しており、透明な角膜ではケラタン硫酸が主体で、混濁した角膜ではケラタン硫酸の割合が減少してコンドロイチン硫酸 B が出現すると報告¹⁷⁾されている。今回の2眼の角膜実質でも、ケラタン硫酸は検出されず、コンドロイチン硫酸 B の存在が確認されたことから、GAG の分子組成の面から、2眼の角膜がびまん性に混濁していたことが説明できる。

ヒト眼球の正常発生では、胎生 5 か月以後の強膜の主要 GAG 分子種はコンドロイチン硫酸 B とされている¹⁸⁾が、今回の2眼の強膜では、いずれもコンドロイチン硫酸 A/C が主な GAG 分子種であったため、Peters 奇形では、角膜のみでなく強膜にも GAG 分子種の質的異常があること、すなわち、前眼部間葉異発生であっても GAG 分子種の面から、後眼部にも異常が及んでいることが証明された。尾山ら¹⁹⁾も前部ぶどう腫を呈した Peters 奇形の GAG 分子種を免疫組織化学的に検討し、GAG 分子種の分布異常が角膜のみでなく、強膜前部まで及んでいたと報告している。角膜の先天異常である Peters 奇形の強膜に、GAG 分子種の異常がみられた原因は、強膜が角膜

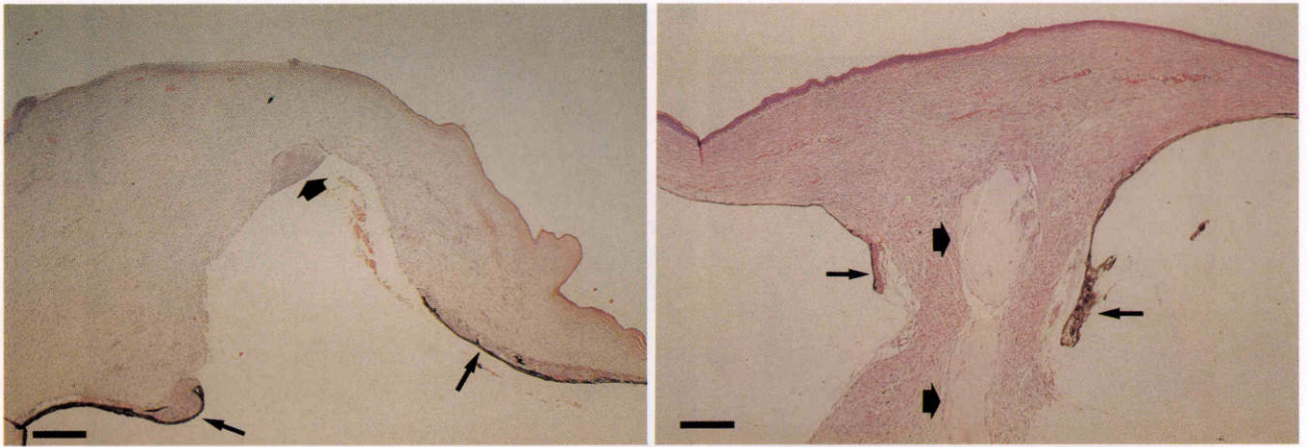


図2 前眼部のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の光学顕微鏡(光顕)写真(a:症例1,b:症例2). 角膜中央部で,内皮,デスメ膜および実質の一部が欠損している.また,実質内に崩壊した水晶体成分(太矢印)がみられる.角膜周辺部では未分化な虹彩組織(細矢印)が角膜後面に癒着し,前房は形成されていない. aのバーは330 μ m,bのバーは270 μ m

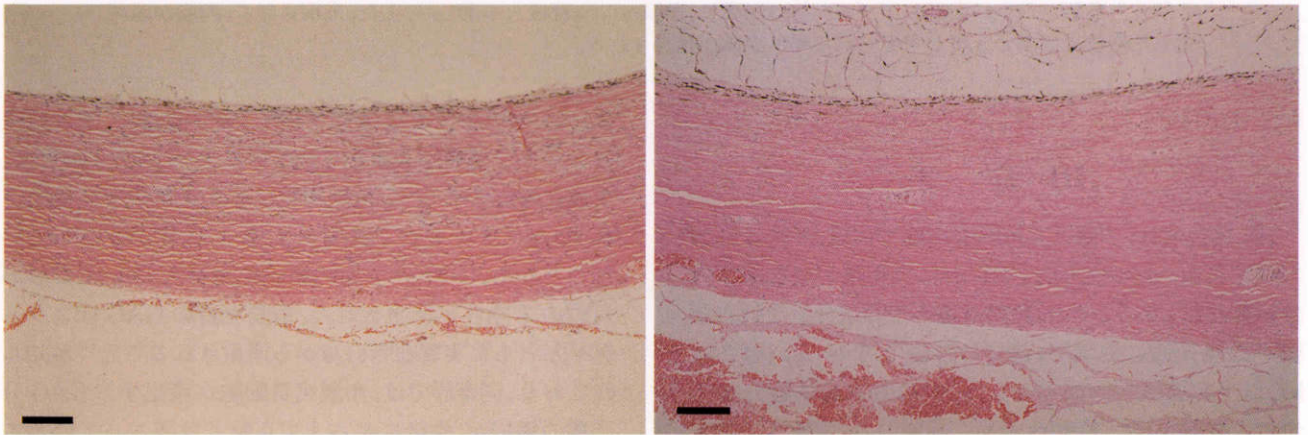


図3 強膜 HE 染色の光顕写真(a:症例1,b:症例2).

2例とも,膠原線維の走行・配列はほぼ正常である.a,bともバーは125 μ m

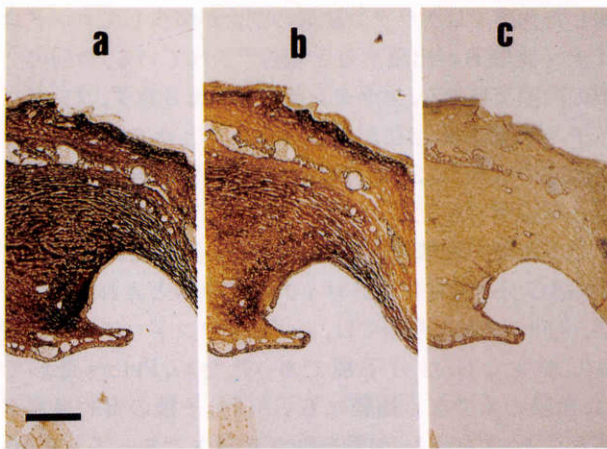


図 4

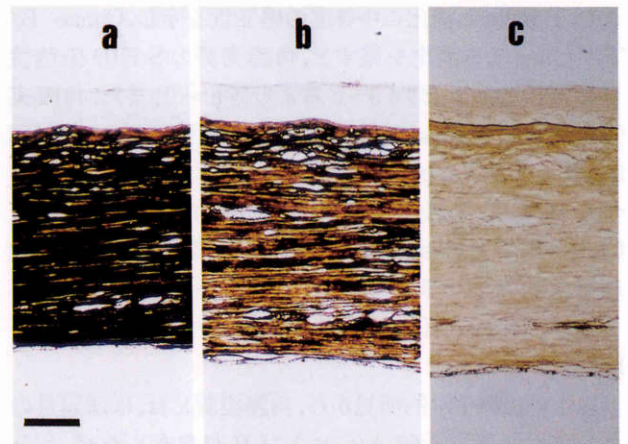


図 5

図4,5はそれぞれ症例1,2のコンドロイチナーゼB(Chase B)/辜丸ヒアルロニダーゼ(T-Hylase)二重消化法を併用した角膜の増感高铁ジアミン(S-HID)染色の光顕写真(a:対照,b:Chase B消化,c:Chase B/T-Hylase二重消化).

2例とも角膜実質はChase BおよびT-Hylase消化にそれぞれ中等度の感受性を示し,Chase B/T-Hylase二重消化の後,実質のS-HID染色性はほぼ消失している.図4のバーは330 μ m,図5のバーは55 μ m

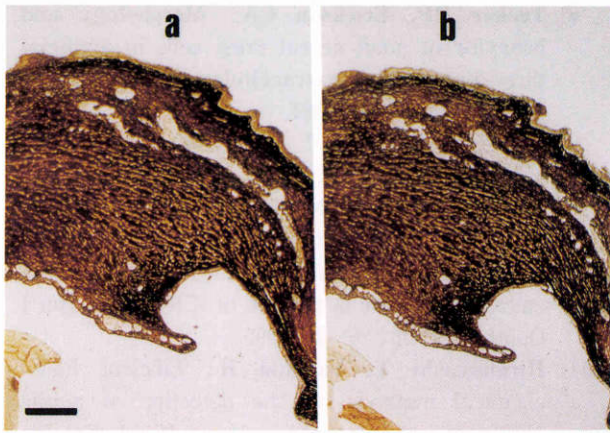


図 6

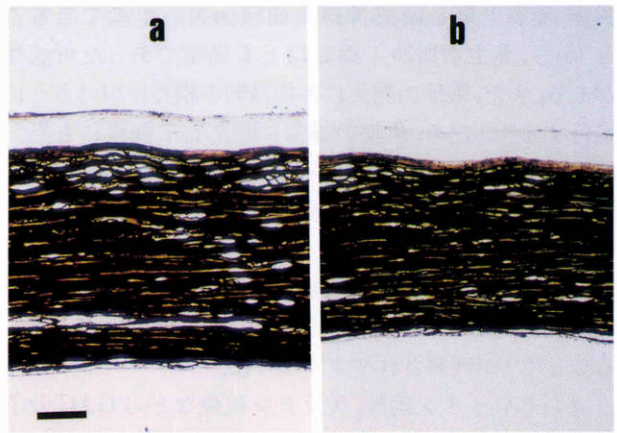


図 7

図 6, 7 はそれぞれ症例 1, 2 の Kase 消化法を併用した角膜の S-HID 染色の顕微鏡写真(a : 対照, b : Kase 消化).
いずれの角膜実質も Kase 消化による S-HID 染色性の減弱はみられない. 図 6 のバーは 330 μm , 図 7 の
バーは 55 μm

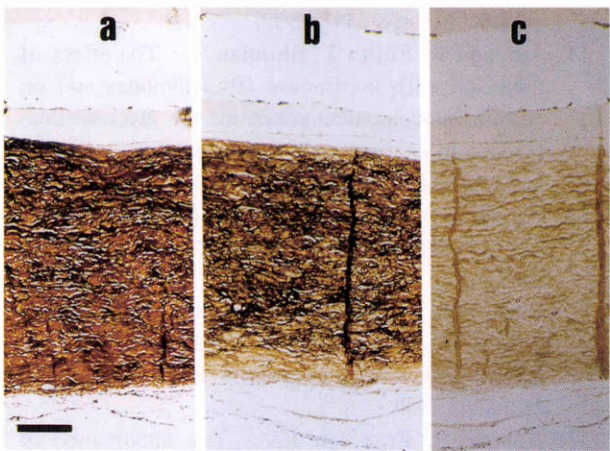


図 8

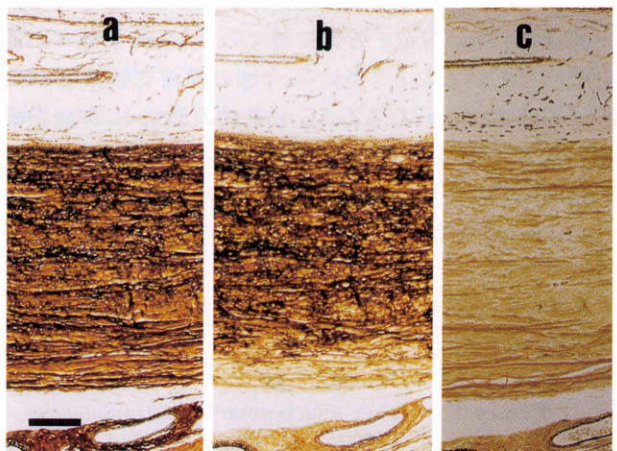


図 9

図 8, 9 はそれぞれ症例 1, 2 の Chase B/T-Hylase 二重消化法を併用した強膜の S-HID 染色の顕微鏡写真
(a : 対照, b : Chase B 消化, c : Chase B/T-Hylase 二重消化).
Chase B 消化による S-HID 染色性の低下より, T-Hylase 消化による染色性の低下が大きい. また, Chase
B/T-Hylase 二重消化の後, 強膜の S-HID 染色性はほぼ消失している. 図 8, 9 ともバーは 135 μm

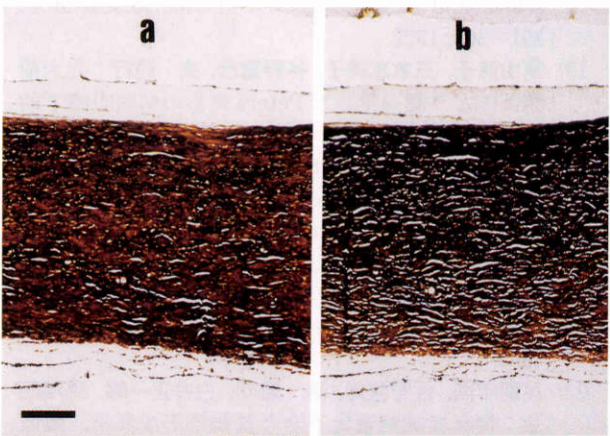


図 10

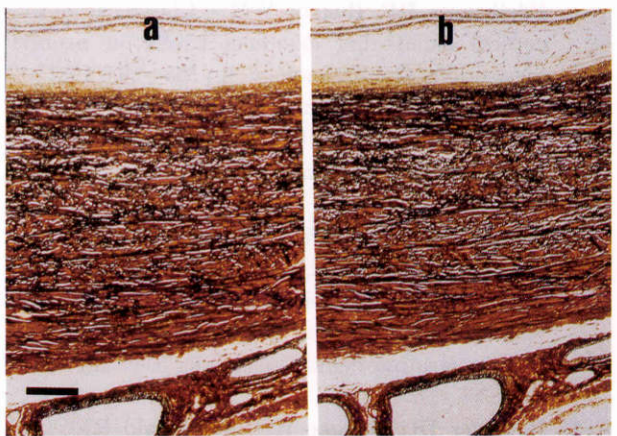


図 11

図 10, 11 はそれぞれ症例 1, 2 の Kase 消化法を併用した強膜 S-HID 染色の顕微鏡写真(a : 対照, b : Kase 消化).
いずれの強膜も Kase 消化による S-HID 染色性の減弱はない. 図 10, 11 ともバーは 135 μm

内皮,実質と同じ頭部神経堤細胞由来の組織であること²⁾から,発生初期から両組織とも異常であった可能性がある。また,眼球の発生は各組織間の相互作用のもとに進行する²⁰⁾²¹⁾ため,角膜の異常に呼応して強膜にも異常が起きた可能性も考えられる。以上のように,角膜のみでなく,角膜と同じ神経堤細胞由来の強膜にもGAG分子種の異常がみられたことから,臨床上,Peters奇形に第一次硝子体過形成遺残⁵⁾や脈絡膜コロポーマ¹⁰⁾など神経堤細胞の発生異常が関与する後眼部の先天異常が合併すること²²⁾²³⁾が理解されやすくなった。

コンドロイチン硫酸,ケラタン硫酸などのGAG分子種は,眼球被膜である角膜および強膜の主要な構成要素であるI型コラーゲン線維の形成・配列に関与している²⁴⁾¹⁵⁾。今回の2症例では,角膜,強膜いずれにもGAG分子種の質的異常があったことから,眼球被膜は脆弱であり,眼球内圧などの二次的作用も加わって,眼球,特に前眼部が拡張して前部ぶどう腫に陥ったものと考えられる。

神経堤細胞の遊走・分化に種々のGAG分子種が影響を及ぼしていること^{6)~8)}から,今回の検討で観察された眼球被膜全体にわたるGAG分子種の異常が,神経堤細胞の正常な発生を障害して,前部ぶどう腫を呈したPeters奇形を成立させた一因となったと考える。

本論文の要旨は,平成7年10月1日に第61回日本中部眼科学会で発表した。

本研究は,文部省科学研究費一般研究A05404059の援助を受けて行った。

文 献

- 1) **Peters A**: Ueber angeborene Defektbildung der Descemetischen Membran. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 44: 27-40, 1906.
- 2) **Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ**: Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 29: 27-43, 1979.
- 3) **Bahn CF, Falls HF, Varley GA, Meyer RF, Edelhauser HF, Bourne WM**: Classification of corneal endothelial disorders based on neural crest origin. *Ophthalmology* 91: 558-563, 1984.
- 4) **Waring GO**: Congenital and neonatal corneal abnormalities. In: *Leibowitz HW (Ed): Corneal Disorders*. WB Saunders, Philadelphia, 29-56, 1984.
- 5) **白井正一郎**: 眼先天異常と遺伝子。眼先天異常の成立機序。日眼会誌 95: 1206-1237, 1991.
- 6) **Derby MA**: Analysis of glycosaminoglycans within the extracellular environments encountered by migrating neural crest cells. *Dev Biol* 66: 321-336, 1978.
- 7) **Bolender DL, Seliger WG, Markwald RR**: A histochemical analysis of polyanionic compounds found in the extracellular matrix encountered by migrating cephalic neural crest cells. *Anat Rec* 196: 401-412, 1980.
- 8) **Tucker RP, Erickson CA**: Morphology and behavior of quail neural crest cells in artificial three-dimensional extracellular matrices. *Dev Biol* 104: 390-405, 1984.
- 9) **馬嶋昭生**: 小眼球症とその発生病理学的分類。日眼会誌 98: 1180-1200, 1994.
- 10) **Ikeda K, Shirai S, Majima A, Hirabayashi Y, Yamada K**: Histological and histochemical studies of the normal and faulty closure of the embryonic fissure in the eye of ICR mouse. *Jpn J Ophthalmol* 39: 20-29, 1995.
- 11) **Hirabayashi Y, Yamada K**: Efficient histochemical methods for the detection of acidic glycoconjugates by means of sensitized diamine procedures. *Connective Tissue* 22: 39-40, 1991.
- 12) **Hirabayashi Y**: Light microscope detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedures. *Histochem J* 24: 409-418, 1992.
- 13) **平林義章, 磯貝文典, 山田和順**: 結合組織酸性複合糖質の光学組織化学における酵素消化法の活用法。結合組織 24: 193-197, 1992.
- 14) **Yamada K, Fujita Y, Shimizu S**: The effect of digestion with keratanase (*Pseudomonas* sp.) on certain histochemical reactions for glycosaminoglycans in cartilaginous and corneal tissues. *Histochem J* 14: 897-910, 1982.
- 15) **村上義洋**: ヒト角膜における酸性ムコ多糖の発生に関する組織化学的研究。日大医誌 35: 421-425, 1986.
- 16) **Elizabeth DH**: Development of the vertebral cornea. In: *Bourne GH, et al (Eds): International Review of Cytology*. Academic Press, New York, 263-322, 1980.
- 17) **Anseth A, Fransson LA**: The importance of polysaccharides for the normal function of the corneal stroma. *Acta Ophthalmol* 48: 455-464, 1970.
- 18) **Breen M, Johnson RL, Sittig RA, Weinstein HG, Veis A**: The acidic glycosaminoglycans in human fetal development and adult life: Cornea, sclera and skin. *Connective Tissue Research* 1: 291-303, 1972.
- 19) **尾山直子, 三木恵美子, 谷野富彦, 東 範行**: 先天前眼部ぶどう腫を呈したPeters奇形の病理組織学的検討。臨眼 48: 1951-1955, 1994.
- 20) **Coulombre AJ, Coulombre JL**: Abnormal organogenesis in the eye. In: *Wilson JG, et al (Eds): Handbook of Teratology*. Vol 2. Plenum, New York, 329-341, 1977.
- 21) **亀山義郎**: 眼球の発生異常。中島 章, 他(編): 薬物と感覚障害。ソフトサイエンス社, 東京, 52-69, 1980.
- 22) **尾関年則, 佐野雅洋, 森 宏明, 白井正一郎, 馬嶋昭生**: 神経堤細胞遊走不全と前眼部形成異常。臨眼 45: 1419-1423, 1991.
- 23) **Heon E, Homsy MB, Cevrette L, Jacob JL, Milot J, Polemeno R, et al**: Peters' anomaly. The spectrum of associated ocular and systemic mal-

- formations. Ophthalmic Paediatr Genet 13 : 137—143, 1992.
- 24) **Borcherding MS, Blacik LJ, Sittig RA, Bizzell JW, Breen M, Weinstein HG** : Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. Exp Eye Res 21 : 59—70, 1975.
- 25) **Scott JE** : Morphometry of Cupromeronic blue-stained proteoglycan molecules in animal corneas, versus that of purified proteoglycans stained *in vitro*, implies that tertiary structures contribute to corneal ultrastructure. J Anat 180 : 155—164, 1991.
-