

# 先天無虹彩の隅角組織におけるグリコサミノグリカンの分布に関する免疫組織化学的検討

浅川 学, 東 範行

国立小児病院眼科

## 要 約

先天無虹彩5例7眼の隅角および周囲組織の病理組織において免疫組織化学的染色によって、ケラタン硫酸を含めたグリコサミノグリカンの分布を検討した。いずれの症例も隅角線維柱帯あるいはSchlemm管の形成不全が認められた。角膜と隅角組織、虹彩実質は、コンドロイチンの染色性はほとんどみられず、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸の免疫染色に対して陽性を示した。デルマトン硫酸に関しては角膜、虹彩実質は陽性を示したが、隅角組織では軽微であり、これらの所見は正常組織とほぼ同様であった。一方、ケラタン硫酸は角膜、隅

角組織とともに痕跡的な虹彩実質でも強く認められた。正常人眼では、ケラタン硫酸は発生期には角膜実質、内皮、隅角組織、虹彩組織に広汎に存在し、周産期に至って虹彩実質から消退する。したがって、先天無虹彩ではケラタン硫酸の分布異常が存在しており、これが神経堤由来の間葉細胞の誘導と分化の異常に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 101: 87-91, 1997)

キーワード：先天無虹彩, グリコサミノグリカン, 隅角組織, 免疫組織化学, 神経堤細胞

## An Immunohistochemical Study on Glycosaminoglycans Distribution in the Trabeculum of Congenital Aniridia

Manabu Asakawa and Noriyuki Azuma

Department of Ophthalmology, National Children's Hospital

### Abstract

Distribution of glycosaminoglycans in the trabecular tissue was immunohistochemically investigated in 7 congenital aniridia eyes of 5 patients aged 0 to 43 days. Paraffin sections of each specimen were immunohistochemically stained with antibodies to chondroitin (clone 1-B-5), chondroitin-4-sulfate (2-B-6), chondroitin-6-sulfate (3-B-3), dermatan sulfate (6-B-6), and keratan sulfate (5-D-4). The trabecular meshwork and Schlemm's canal in all eyes were absent or not well differentiated. The cornea, trabecular tissue, and iris stroma were negative for chondroitin immunostaining but positive for chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate and keratan sulfate im-

munostaining. In the normal anterior segment tissue keratan sulfate is present in the cornea, trabecular tissue, and iris at the fetal stage, and disappears from the iris at the neonatal stage. These findings suggest that the persistence and/or abnormal distribution of keratan sulfate in the anterior segment may play a role in the pathogenesis of congenital aniridia. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 87-91, 1997)

Key words: Aniridia, Glycosaminoglycans, Trabecular tissue, Immunohistochemical study, Neural crest

## I 緒 言

先天無虹彩は虹彩や隅角が未熟であることが特徴であるが、それとともに、角膜周囲の血管新生を伴った混濁や

視神経低形成、黄斑低形成などを合併する眼球全体の先天異常と考えられている<sup>1)2)</sup>。その病因には諸説があり、神経外胚葉由来の細胞の異常、中胚葉由来の細胞の異常、あるいは神経堤由来の間葉細胞の異常に起因するなどさ

別刷請求先：154 東京都世田谷区太子堂 3-35-31 国立小児病院眼科 浅川 学

(平成8年4月5日受付, 平成8年8月5日改訂受理)

Reprint requests to: Manabu-Asakawa, M.D. Department of Ophthalmology, National Children's Hospital, 3-35-31 Taishidou, Setagaya-ku, Tokyo 154, Japan

(Received April 5, 1996 and accepted in revised form August 5, 1996)

さまざまな説が提唱されているが、明確な見解の統一はなされていない<sup>2)</sup>。しかし近年、分子遺伝学の発達に伴って、先天無虹彩を起す遺伝子の異常が明らかになりつつあり、PAX6 遺伝子が原因遺伝子として考えられるようになってきた<sup>3)~6)</sup>。PAX6 遺伝子は眼発生のさまざまな時期に発現する転写因子遺伝子であり、ヒトでは先天無虹彩の他に Peters 奇形<sup>7)</sup>、小眼球<sup>8)</sup>、瞳孔偏位<sup>8)</sup>でその変異が見出されている。前眼部の形成に重要であり、異常の程度が強いと初期の眼杯形成が全体的に障害されて無眼球になると考えられている<sup>9)</sup>。さらに、PAX 6 遺伝子の異常が神経堤由来の間葉細胞の遊走、分化を阻害することが報告<sup>9)</sup>されており、虹彩組織や角膜実質の発生異常の原因となることが推測される。

一方、グリコサミノグリカンは強角膜の主要成分の一つであり、コラーゲンの重合や組織の形態保持、安定に関与している。この他に、発生期には細胞の誘導、分化に影響を与えるといわれている<sup>10)11)</sup>。コンドロイチン硫酸系は角膜や強膜に広汎に存在するが、ケラタン硫酸は角膜に固有である<sup>10)11)</sup>。発生期の眼組織におけるケラタン硫酸の変化については免疫組織化学的検討が行われているが、発生初期の前眼部ではケラタン硫酸が角膜実質のみならず、内皮、隅角組織、虹彩、前部硝子体血管を含めた間葉細胞由来の組織に広く存在し、後期には角膜と隅角組織を除いて消退する<sup>12)</sup>。このように、ケラタン硫酸が間葉細胞由来の組織に一過性に出現することは、ケラタン硫酸がこれらの組織の発生、分化に関与していることを示唆している。したがって、今回我々は先天無虹彩の前眼部異常において、ケラタン硫酸を含めたグリコサミノグリカンの分布を免疫組織化学的に検討した。

## II 試料と方法

試料は、国立小児病院の剖検例で先天無虹彩が認められた5例7眼である。これらは、家族の承諾を得て剖検時に眼球の摘出を行った。男性2例、女性3例であり、両眼性2例、片側性3例であった。年齢は出生後0~43日であった。

全例で全身の先天異常を合併しており、D<sub>1</sub> trisomy 3例、Rubinstein-Taybi 症候群1例、多発奇形1例であっ

た。全例とも心奇形を合併しており、心不全によって死亡したため、生存中の縁内障の有無については明らかではなかった。

これらの標本は10%ホルマリンで固定後、パラフィンに包埋した。3 μm切片を作成し、コンドロイチン、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸(各クローン1-B-5, 2-B-6, 3-B-3, 6-B-6, 5-D-4, 生化学工業<sup>13)~15)</sup>)のモノクローナル抗体を用いて peroxidase antiperoxidase 法<sup>16)</sup>に従って免疫組織化学的染色を行い、光学顕微鏡で隅角および周囲組織の所見を観察した。

## III 結果

光学顕微鏡下には、いずれも角膜実質の線維の走行は輪部付近までほぼ正常であり、内皮、デスメ膜にも異常はみられなかった。いずれも虹彩は痕跡的に存在し、完全欠損を示したものはなかった。隅角線維柱帯はいずれも高度の形成不全が存在していた。隅角組織は間葉細胞と膠原線維から成り、線維柱帯に相当する部位は、角膜、強膜とつらなる充実組織となっていた。Schlemm(シュレム)管が認められたものが5眼で、1眼はほぼ正常であったが、4眼では多数の細い管腔がみられ、多分枝を呈していた。その他の2眼ではSchlemm管は存在していなかった。各症例の内訳と隅角組織の病理所見を表1にまとめ示す。

免疫組織化学的染色所見は7眼とも共通であった。角膜と隅角組織、虹彩実質はコンドロイチンに対する抗体ではほとんど染色性がみられず、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸の各抗体に対しては、程度の差はあるものの陽性を示した(図1)。殊にケラタン硫酸については、対照眼では角膜と隅角組織に限局していたのに対して(図2)、先天無虹彩ではこれに加えて虹彩実質にも染色性がみられた(図1e)。6眼では虹彩実質が広汎に強く染色され、症例4の1眼では血管周囲を中心として染色性がみられたが、実質では軽微であった。

表1 各症例の内訳と隅角組織の病理所見

症例	性	日齢	患側	隅角線維柱帯	Schlemm	全身合併症
1	女	1	右	細胞の配列が不規則、 膠原線維が充満	ほぼ正常	D <sub>1</sub> trisomy
			左	充実組織	存在しない	
2	男	7	左	充実組織	存在しない	D <sub>1</sub> trisomy
3	男	36	右	充実組織	多数の細い管腔	D <sub>1</sub> trisomy
			左	充実組織	多数の細い管腔	
4	女	0	右	充実組織	極めて細い管腔	Rubinstein-Taybi 症候群
5	女	43	左	細胞の配列が不規則、 膠原線維が充満	多数の細い管腔	多発奇形

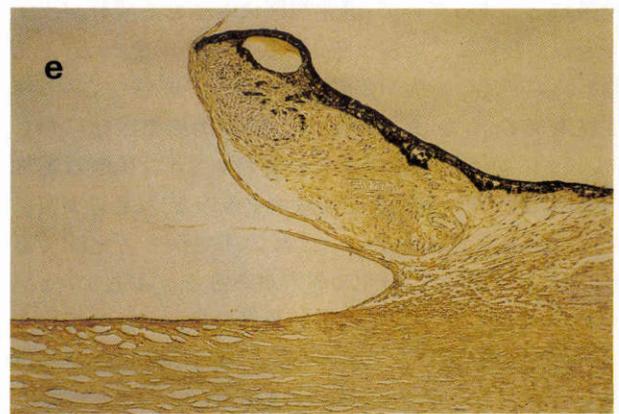
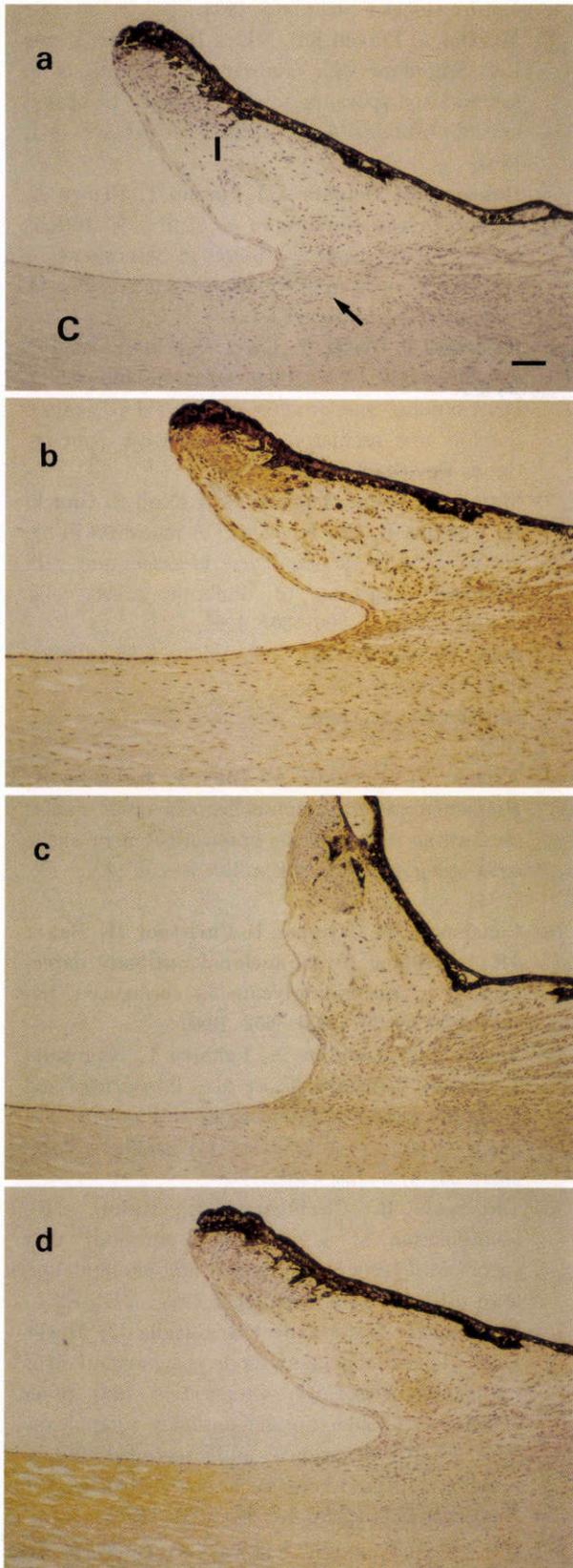


図1 症例1右眼の隅角および痕跡的な虹彩のコンドロイチン(a),コンドロイチン4硫酸(b),コンドロイチン6硫酸(c),デルマトン硫酸(d),ケラタン硫酸(e)に対する免疫染色所見。

隅角組織は、間葉細胞と膠原線維により充実組織となっている。Schlemm管は認められる(矢印)、コンドロイチンは角膜(C),隅角組織,虹彩実質(I)のいずれも染色性をほとんど認めないが、コンドロイチン4硫酸,コンドロイチン6硫酸,デルマトン硫酸,ケラタン硫酸では、角膜,隅角組織,虹彩実質は陽性を示す。デルマトン硫酸の染色性は隅角組織では軽微である。バーは0.1mm

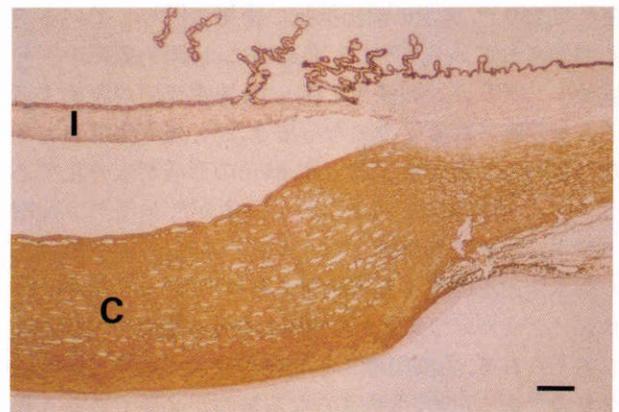


図2 胎齢40週の正常ヒト前眼部のケラタン硫酸免疫染色所見。

角膜(C)および隅角組織は陽性を示すが、虹彩実質(I)の染色性はほとんど認められない。バーは0.1mm

#### IV 考 按

今回検討した先天無虹彩では、コンドロイチン,コンドロイチン4硫酸,コンドロイチン6硫酸,デルマトン硫酸は、いずれも正常眼との差はみられなかったが、ケラタン

硫酸は角膜,隅角組織のみならず、虹彩実質にまで広汎に存在しており、分布異常がみられた。発生期の正常前眼部組織では、通常では胎生6週頃から、ケラタン硫酸が角膜から隅角組織および虹彩実質にかけてみられるが、周産期に至ると、角膜と隅角組織を残して、虹彩実質ではほとんど消失する<sup>12)</sup>。発生期にケラタン硫酸陽性の組織はいずれも神経堤由来の間葉細胞と考えられ、ケラタン硫酸はこれらの誘導、分化に深く関与していると思われる。ケラタン硫酸の分布異常がみられた原因として、一つには組織の異形成とともにケラタン硫酸が異所性に産生されたと考えることができる。他には、これらの組織が未熟な

段階にとどまっています、発生初期にみられる成分が出生後もなお残存していると考えられる。一方、先天無虹彩の発症に炎症や創傷治癒の機転が関与している可能性もある。しかし、炎症あるいは創傷治癒機転に際して、コンドロイチン硫酸系およびデルマトン硫酸は増加するが、ケラタン硫酸は逆に減少するので<sup>17)</sup>、虹彩実質に強陽性にみられたケラタン硫酸の所見から否定的であり、間葉細胞の誘導、分化の異常があることは明らかと思われる。今回の症例では遺伝子変異の検討は行っていないが、先天無虹彩では *PAX6* 遺伝子の異常が発見されており<sup>3)-6)</sup>、さらにラットでは *PAX6* 遺伝子の異常により神経堤細胞の遊走、分化が阻害されて発生異常が生じることが分子生物学的に証明されている<sup>9)</sup>。今回、先天無虹彩では、虹彩を含む前眼部ではケラタン硫酸の分布異常がみられ、間葉細胞の異常が存在する可能性が強く示唆された。したがって、これは分子生物学的な知見を支持するものである。

グリコサミノグリカンは組織において比較的緩徐であるが代謝回転されているので<sup>10)11)</sup>、先天無虹彩では未熟な虹彩や隅角周囲組織において、出生後もなおケラタン硫酸の産生が持続している可能性がある。開放隅角緑内障患者の前房隅角にはグリコサミノグリカンが豊富に存在しており<sup>18)</sup>、房水の流出抵抗に密接に関与していることが知られているが<sup>19)-22)</sup>、発達期には、隅角組織のグリコサミノグリカンの減少に伴って、房水流出が開始することが示唆されるようになってきた<sup>23)</sup>。先天無虹彩に早期に緑内障を合併する例では、隅角の形成が未分化であることが主な原因と考えられているが<sup>2)</sup>、ケラタン硫酸の産生が出生後も持続しているのであれば、隅角組織内の房水流出を障害する可能性もあり、このようなグリコサミノグリカンの異常が緑内障の発症に関与しているとも考えられる。免疫組織化学的検討はあくまでも定性的なものであるため、今後さらなる検討が必要であると思われる。

#### 文 献

- 1) **Spencer WH**: Ophthalmic Pathology. Vol 1. 3rd ed, WB Saunders, Philadelphia, 531—533, 1985.
- 2) **Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L**: Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol* 28: 621—642, 1984.
- 3) **Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, et al**: The human *PAX6* gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet* 1: 328—332, 1992.
- 4) **Davis A, Cowell JK**: Mutations in the *PAX6* gene in patients with hereditary aniridia. *Hum Molec Genet* 2: 2093—2097, 1993.
- 5) **Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL**: *PAX6* gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genet* 7: 463—465, 1994.
- 6) **Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H, Lyons LA, Saunders GF**: Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am J Hum Genet* 54: 801—811, 1994.
- 7) **Hanson IM, Fletcher JM, Jordan T, Brown A, Taylor D, van Heyningen V, et al**: Mutations at the *PAX6* locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nature Genet* 6: 168—173, 1994.
- 8) **Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL**: Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the *PAX6* paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8: 2022—2034, 1994.
- 9) **Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Eto K, et al**: A mutation in the *PAX6* gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nature Genet* 3: 299—304, 1993.
- 10) 永井 裕, 梶川欽一郎: コラーゲン—化学, 生物学, 医学—。南江堂, 1975.
- 11) 梶川欽一郎: 結合組織。金原出版, 東京, 325—336, 1984.
- 12) **Azuma N, Hirakata A, Hida T, Kohsaka S**: Histochemical and immunohistochemical studies on keratan sulfate in the anterior segment of the developing human eye. *Exp Eye Res* 58: 277—286, 1994.
- 13) **Couchman JR, Catterson B, Christner JE, Baker JR**: Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissues. *Nature* 307: 650—652, 1984.
- 14) **Sobue M, Nakashima N, Fukatsu T, Nagasaka T, Katoh T, Ogura T, et al**: Production and characterization of monoclonal antibody to dermatan sulfate proteoglycan. *J Histochem Cytochem* 36: 479—485, 1988.
- 15) **Catterson B, Christner JE, Baker JR**: Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate. *J Biol Chem* 258: 8848—8854, 1983.
- 16) **Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG**: The unlabelled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complexes (Horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315—333, 1970.
- 17) **Hart Jr. WM**: Adler's physiology of the eye 9th ed. In: Jay S, et al (Eds): The Cornea. Mosby-Year Book, St Louis, 29—70, 1992.
- 18) **Armaly MF, Wang Y**: Demonstration of acid mucopolysaccharides in the trabecular meshwork of the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol* 14: 507—516, 1975.
- 19) **Zimmerman LE**: Demonstration of

- hyaluronidase-sensitive acid mucopolysaccharide. *Am J Ophthalmol* 44: 1-4, 1957.
- 20) 瀬川雄三：線維柱組織における酸性粘液多糖類の局在。臨眼 24: 363-367, 1970.
- 21) Grierson I, Lee WR: Acid mucopolysaccharides in the outflow apparatus. *Exp Eye Res* 21: 417-431, 1975.
- 22) Mizokami K: Demonstration of masked acidic glycosaminoglycans in the normal human trabecular meshwork. *Jpn J Ophthalmol* 21: 57-71, 1977.
- 23) 谷野富彦, 樋田哲夫, 東 範行：発達期人眼の前房隅角の発生に関する組織化学的・電子顕微鏡的研究。日眼会誌 97: 310-317, 1993.
-