

小眼球症マウスにおける眼瞼発生過程の組織学的検索

野崎 実穂¹⁾, 馬嶋 昭生¹⁾, 池田 晃三²⁾, 平林 義章³⁾

¹⁾名古屋市立大学医学部眼科学教室, ²⁾公立尾陽病院, ³⁾名古屋市立大学医学部第二解剖学教室

要 約

Cts マウスは, Jcl:ICR マウスの突然変異種で, そのホモ接合体は先天白内障とそれに伴う小眼球症を発症する。今回我々は, *Cts* マウスを用いて生後の瞼裂幅と眼瞼の発生過程を組織学的に検索した。ホモ接合体の瞼裂幅は生後 2~6 週までのどの時期においても正常マウスに比べて有意に狭かった。次に, 胎生 14 日から生後 14 日までのホモ接合体と正常マウスの眼部にヘマトキシリン・エオジン染色を行い, 光学顕微鏡で観察した。両マウスの眼瞼はともに胎生 16 日に閉瞼し, 生後 14 日には開瞼した。正常マウスとホモ接合体ともに, 眼輪筋の原基は胎

生 16 日に, 毛包とマイボーム腺の原基は胎生 18 日に識別が可能となり, 眼瞼発生過程において両マウス間で組織学的に有意な差は観察されなかった。従来, 眼瞼の発生は組織相互作用を受けず, self-determining といわれてきたが, 今回の結果はそれを支持するものと考えられる。(日眼会誌 102:540—544, 1998)

キーワード: *Cts* マウス, 小眼球症, 瞼裂幅, 眼瞼発生, 組織相互作用

Histological Studies in the Developing Eyelids of Congenital Microphthalmic (*Cts*) Mice

Miho Nozaki¹⁾, Akio Majima¹⁾, Kozo Ikeda²⁾ and Yoshifumi Hirabayashi³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

²⁾Biyoh Hospital, ³⁾Department of Anatomy, Nagoya City University Medical School

Abstract

The *Cts* mouse is a mutant of the Jcl:ICR strain with congenital cataract and small eyes in homozygotes. In the present study, attempts were made to measure postnatally the palpebral fissure and to examine the process of eyelid development by light microscopy in both normal (+/+) and homozygous (*Cts/Cts*) mice. The width of the palpebral fissure in homozygotes was significantly smaller than in unaffected mice. To investigate the process of eyelid development, tissue specimens from normal and *Cts* homozygous mice were prepared with hematoxylin and eosin, and observed by light microscopy on days 14, 16, and 18 of gestation and on days 0, 7, and 14 after birth. In both groups, the eyelid fused on day 16 of gestation and opened completely on day 14 af-

ter birth. The primordium of the orbicularis oculi muscle was defined on day 16 of gestation, and the primordia of hair follicles and Meibomian glands were detected on day 18 of gestation. In the present study, there were no significant differences in the process of eyelid development between normal and homozygous mice. Eyelid development has thus far been thought to be self-determining and not affected by tissue interaction, and the present findings support this line of thought. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 540—544, 1998)

Key words: *Cts* mice, Microphthalmia, Palpebral fissure, Eyelid development, Tissue interaction

I 緒 言

先天白内障とそれに伴う小眼球症は, 臨床的に重要な疾患である。大鳥ら¹⁾は日本クレア社から入手した Jcl:

ICR マウスの中から両眼に白内障を有する雌を発見し, 交配実験の結果, ホモ接合体で先天白内障と小眼球症を発現する単一の遺伝子 *Cs* を発表した。しかし, この遺伝子記号は他の遺伝子と遺伝子記号が重複していたので,

別刷請求先: 467-8601 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 野崎 実穂
(平成 9 年 9 月 18 日受付, 平成 10 年 3 月 20 日改訂受理)

Reprint requests to: Miho Nozaki, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School.
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467-8601, Japan
(Received September 18, 1997 and accepted in revised form March 20, 1998)

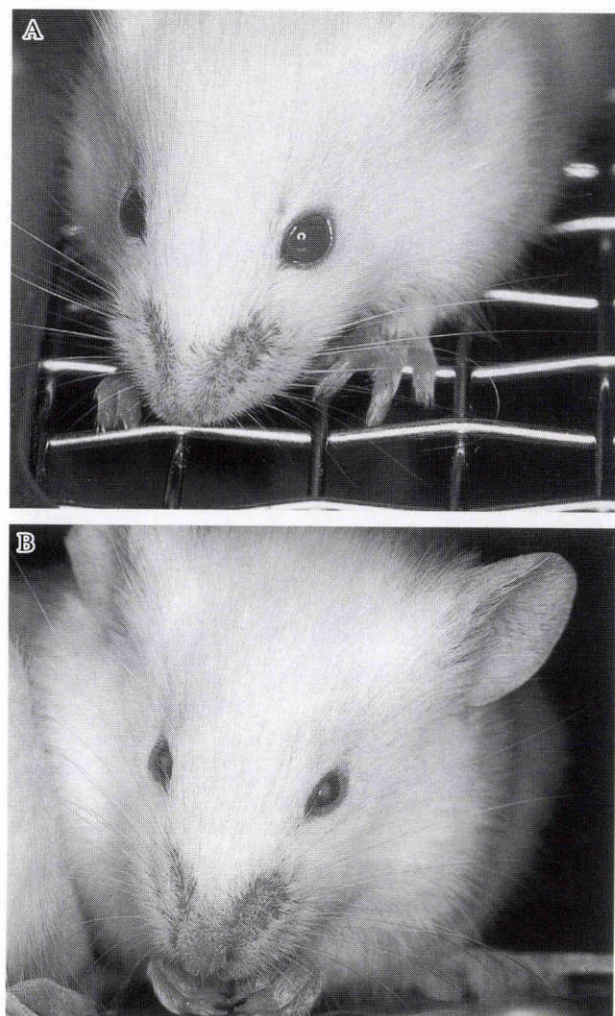


図 1 生後 2 週の正常マウス(A)とホモ接合体(B).
ホモ接合体ではすでに白内障と小眼球が著明である.

表 1 生後の瞼裂幅(単位: mm)

瞼裂幅	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週
+/+	2.5	3.0	3.6	3.6	3.7
Cts/Cts*	1.5	2.0	2.0	2.0	2.2

*: 対応のない Wilcoxon 検定, $n = 5$, $p < 0.01$

後に *Cts* と改められた²⁾. 当教室では, ヘテロ接合体も先天白内障とホモ接合体と正常の中間の小眼球となることを証明し³⁾, さらに水晶体³⁾, 角膜⁴⁾, 強膜⁵⁾, Bruch 膜⁶⁾などの眼組織を組織学的および組織化学的に検索し, 小眼球症の成立機序について検討してきた. 今回, 著者らは *Cts* マウスホモ接合体の生後の瞼裂幅と, 胎生期から生後の眼瞼発生過程を組織学的に検索したので報告する.

II 実験方法

1. 実験動物

Cts マウスを交配した子孫のうち, ホモ接合体(*Cts*/

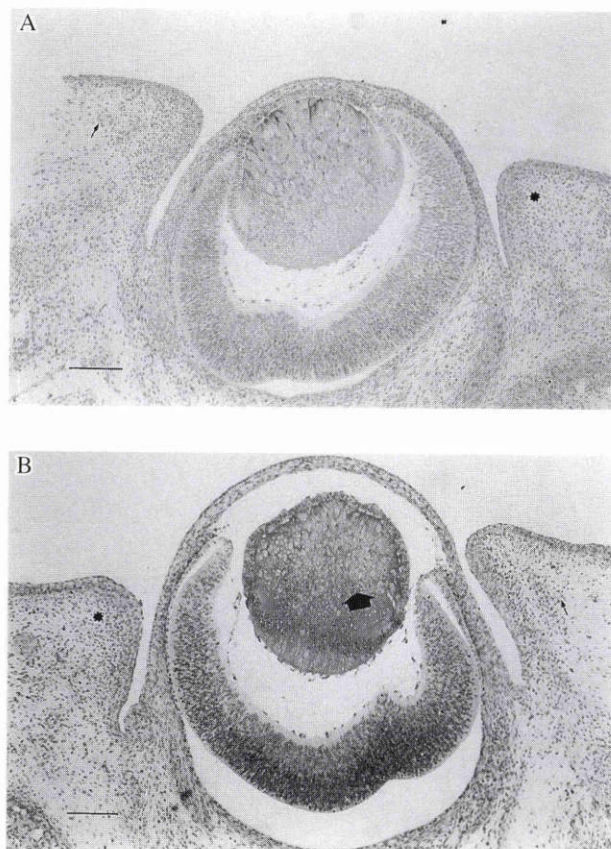


図 2 胎生 14 日の正常マウス(A)とホモ接合体(B)の眼部ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の光学顕微鏡(光頭)写真.

いずれも角膜はまだ露出しており, 眼瞼上皮下には間葉細胞(*印)や血管(細矢印)が観察される. ホモ接合体の水晶体では線維細胞の変性(太矢印)がみられる. バーは 115 μ m

Cts)を用いて正常マウス(+/+)を対照とした. 成熟した雄 1 匹と未経産で発情期の雌 1 匹を一晩同一飼育箱に入れ, 翌日膈栓を認めたものを妊娠 0 日とした. 瞼裂幅測定には, 生後 2~6 週の正常マウスおよびホモ接合体をそれぞれ 5 匹用いた. 胎生期は, 妊娠 14, 16, 18 日の母獣を頸椎脱臼により屠殺して胎仔を取り出し, 胎生 14, 16, 18 日齢とし, 組織学的検索を行った. また, 生後のマウスは出生日を生後 0 日として, 生後 0, 7, 14 日の動物を屠殺して用いた. 各検索日について 5 匹ずつ用いた.

2. 方法

1) 瞼裂幅測定

生後 2~6 週までの正常マウスおよび *Cts* マウスホモ接合体の瞼裂幅を, 自然開瞼時に M 型標準ノグス(N-15, ミットヨ製)を用いて測定した. 計測は, 右眼の瞼裂幅を 1 匹当たり 3 回測定し, その平均を測定値とした.

2) 組織学的方法

眼部組織塊を Bouin 液固定後, 型のごとくエタノール脱水・パラフィン包埋し, 厚さ 2 μ m の前頭断連続切片

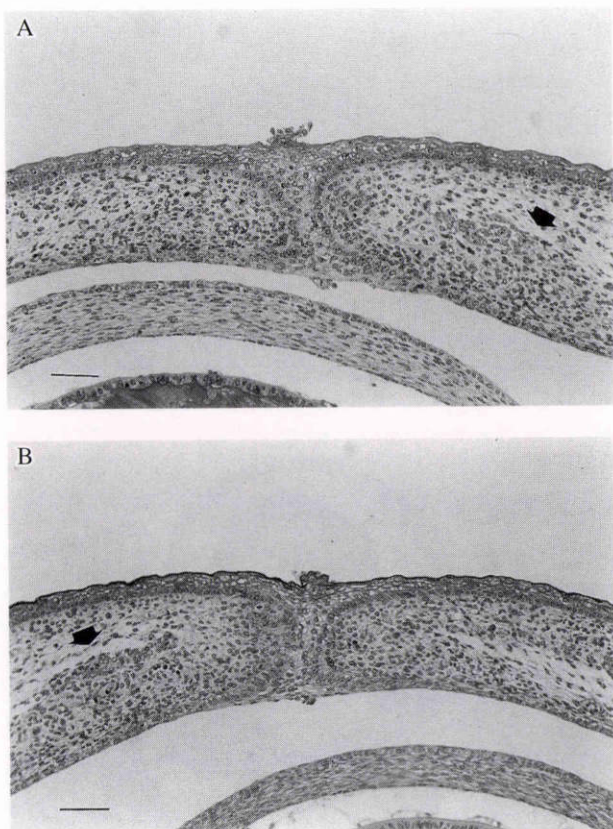


図3 胎生16日の正常マウス(A)とホモ接合体(B)の前眼部 HE 染色の光顕写真。

両者とも眼瞼の上皮が融合し閉瞼している。表皮下の結合組織では細胞成分が増加し、眼輪筋原基(矢印)を形成している。バーは60 μ m

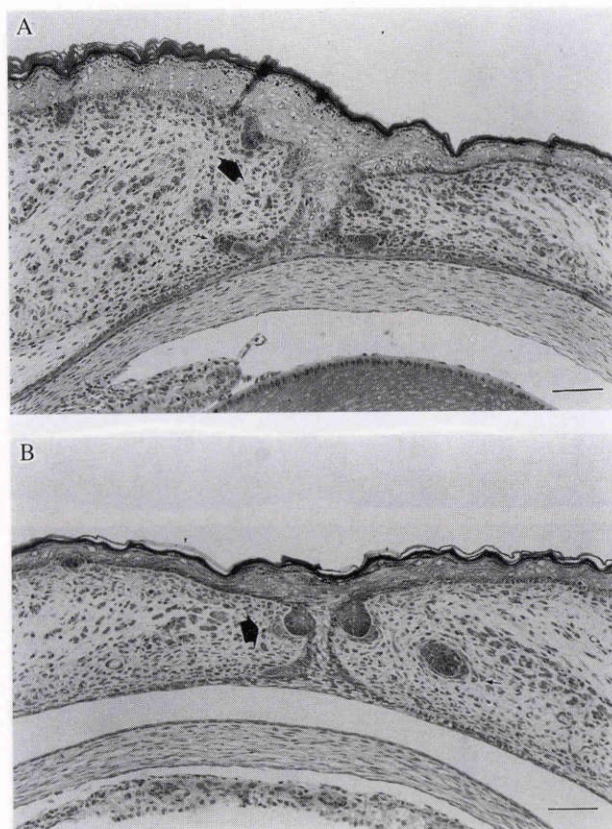


図4 胎生18日の正常マウス(A)とホモ接合体(B)の前眼部 HE 染色の光顕写真。

上皮基底細胞が真皮内へ陥入し、その周囲を真皮の間葉細胞が取り囲み、毛包(太矢印)やマイボーム腺(細矢印)の原基を形成している。バーは60 μ m

を作製した。脱パラフィン、水和後にヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. 瞼 裂 幅

生後2週では、正常マウス、ホモ接合体とも開瞼していたが、ホモ接合体ではすでに白内障と小眼球症が認められた(図1)。対応のない Wilcoxon 検定を用いて正常マウスとホモ接合体間で、それぞれの瞼裂幅の比較検討を行った。ホモ接合体の瞼裂幅は、生後2~6週までのいずれの時期においても、正常マウスに比べて有意に狭かった(表1)。

2. 組織学的検索

胎生14日には、正常マウスおよびホモ接合体ともに眼球周囲に2層の細胞から成る上皮と、上皮下の結合組織から構成される眼瞼隆起が確認されたが、角膜は露出していた。眼瞼上皮下には間葉細胞や血管が観察された。ホモ接合体の水晶体には水晶体線維細胞の変性が認められた(図2)。胎生16日には正常マウス、ホモ接合体ともに眼瞼上皮は融合し、閉瞼した。融合部には胞体の明るい周皮細胞塊が表皮側と結膜側に突出していた。最外層の上

皮は角質化し、その下に扁平上皮細胞層、2~3層の胞体の明るい細胞層、立方または円柱細胞層が認められ、表皮の様相を呈してきた。結膜側の上皮は薄く、表皮側の上皮のように明らかな層状化はみられなかった。表皮下の結合組織では細胞成分が増加し、眼輪筋原基を形成した(図3)。胎生18日では、正常マウスとホモ接合体の両者ともに眼瞼表皮の分化が進み、角質化が顕著で、顆粒層と有棘層が明確に識別できた。さらに、上皮基底細胞が真皮側へ陥入し、その周囲に間葉細胞が集まり、毛包やマイボーム腺の原基が認められ、真皮層の形成が進んだ。眼瞼融合部の周皮細胞塊は消失した(図4)。生後0日には、正常マウス、ホモ接合体ともに上下眼瞼の真皮は発達し、眼瞼融合部に向かって伸展した(図5)。生後7日には、正常マウスおよびホモ接合体の表皮の角質化がさらに進み、眼瞼融合部へ進入し始めた(図6)。生後14日には、正常マウスおよびホモ接合体ともに上皮が完全に瞼縁を覆い、再び開瞼した。成熟したマイボーム腺が眼瞼縁に開口し、結膜では杯細胞も認められた(図7)。

IV 考 按

当教室での研究で、*Cts* マウスホモ接合体の水晶体は、

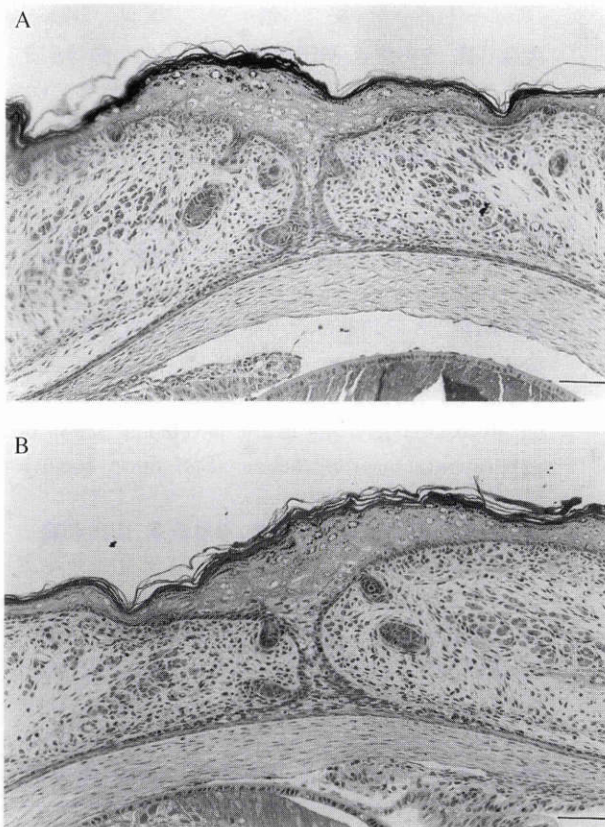


図5 生後0日の正常マウス(A)とホモ接合体(B)の前眼部 HE 染色の光顕写真。

上下眼瞼の真皮は発達し、眼瞼融合部に向かって伸展している。バーは 60 μm

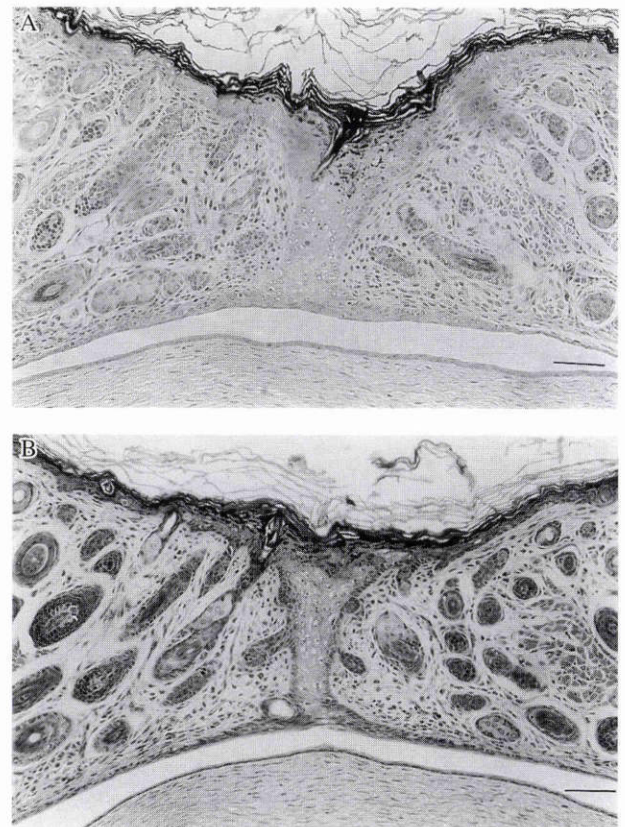


図6 生後7日の正常マウス(A)とホモ接合体(B)の前眼部 HE 染色の光顕写真。

いずれも表皮の角質化がさらに進み、眼瞼融合部へ進入し始めている。バーは 60 μm

組織学的に胎生 14 日から水晶体線維の膨化、変性が観察され、眼球の発生過程において水晶体と眼球の組織相互作用が障害されるため、小眼球症が発症することを証明した³⁾。さらに、*Cts* ホモ接合体では眼球被膜である角膜⁴⁾や強膜⁵⁾ならびに物質交換の場である Bruch 膜⁶⁾でコンドロイチン硫酸の質的な異常がみられ、水晶体だけではなく他の眼組織も障害されていることを明らかにした。

今回、著者らは、眼球との組織相互作用を受けずに独自に発生するといわれてきた眼瞼に着目し、生後の瞼裂幅について検索した結果、生後のホモ接合体の瞼裂幅は正常マウスのそれと比べて有意に狭いことが確認された。この原因を解明するため、正常マウスとホモ接合体の眼瞼を光学顕微鏡で観察し、両者の眼瞼組織の発生過程に生じる形態的相違について検索したが、有意な差はなかった。

眼球発生には眼組織間の組織相互作用が重要である⁷⁾が、臨床的に小眼球症や無眼球が眼瞼の形成異常を伴わないこと⁸⁾⁹⁾から、眼瞼の発生・分化・成熟は神経外胚葉の関与を受けずに独自に進行すると考えられている。さらに、Mann¹⁰⁾の成書には、眼窩、眼瞼、涙器、結膜囊および

外眼筋とその神経の発生は self-determining であると記述されており、本結果もこれを支持するものであった。*Cts* マウスの瞼裂幅が有意に狭かった原因は、眼瞼発生は正常であったが、小眼球により眼窩内容積が減少し、相対的な眼瞼過形成が生じたため、瞼裂幅が狭まったと推定された。

ヒトの眼瞼は胎生 6 週頃に表面外胚葉の襞として発生する。胎生 3 か月になると上下の眼瞼原基がさらに発育し、その後相互に接着・融合して眼瞼は閉鎖する。胎生 6 か月に眼瞼裂が形成され始め、胎生 7 か月には完全に分離・開瞼し、眼瞼の各組織が分化・発育する¹¹⁾。また、ヒトの胎生 6 週、3 か月および 6 か月は、マウスの胎生 14、16 日および生後 14 日にそれぞれ相当する¹²⁾。以上から、先天白内障を伴う小眼球症のヒトモデルとして *Cts* マウスを使用することは、実験奇形学的に有用であり、今回得られた結果は、ヒトにおける先天白内障を伴う小眼球症の眼瞼の発生過程を反映するものと考えられた。

眼瞼の各組織では、睫毛やマイボーム腺は表面外胚葉から発生し、眼輪筋や瞼板は間葉組織から発生する¹³⁾。また、頭頸部間葉細胞は神経堤細胞由来であること¹⁴⁾から、眼輪筋、瞼板は神経堤細胞から発生すると考えられてい

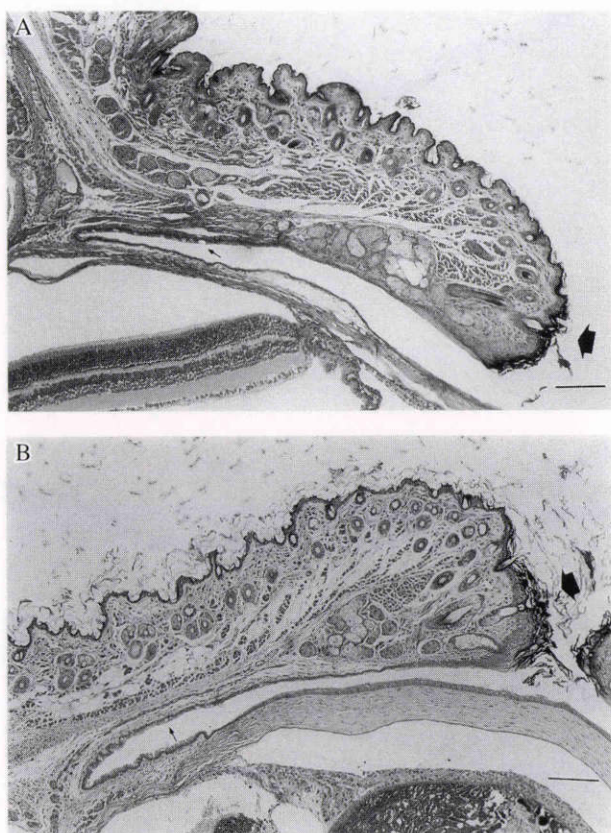


図7 生後14日の正常マウス(A)とホモ接合体(B)の前眼部 HE 染色の光顕写真。

成熟したマイボーム腺(太矢印)が眼瞼縁に開口し、結膜では杯細胞(細矢印)も認められる。バーは70 μm

る¹⁰⁾。本研究では胎生16~18日にかけて表皮下結合組織内で間葉細胞が集合し、眼輪筋原基や瞼板原基を形成している像が観察された。この時期に眼組織に移動する間葉細胞は神経堤細胞由来であること¹⁵⁾から、本研究結果からも、眼瞼に存在する眼輪筋、瞼板は神経堤細胞由来であることが推測された。

今回、正常マウスと小眼球症マウス間で、眼瞼の発生過程には組織学的に有意な差がなかったが、今後組織化学的検索を行い、眼瞼の発生・分化・成熟の機序を検討する。

本論文の要旨は、第62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A 05404059の援助を受けて行った。

文 献

- 1) 大鳥 寛, 吉田豊彦, 狗田忠義: マウスの小眼球症をともしなう遺伝的白内障について. 実験動物 17: 91—96, 1968.
- 2) 日本実験動物研究会系統部会: 近交系の公表について. 実験動物 24: 123—124, 1975.
- 3) 小林久生, 馬嶋昭生, 橋本 勝: *Cts* マウスの小眼球症発現機序に関する研究(第1報). 眼紀 32: 680—685, 1981.
- 4) 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.
- 5) Ozeki H, Hirabayashi Y: Histochemical studies on glycosaminoglycans in the developing sclera of experimental microphthalmic (*Cts*) mice. Nagoya Med J 38: 89—97, 1993.
- 6) 宇野 真, 池田晃三, 馬嶋昭生, 平林義章, 山田和順: 小眼球症マウス Bruch 膜に分布するグリコサミノグリカン分子種の組織学的検討. 日眼会誌 100: 126—131, 1996.
- 7) Coulombre AJ: The eye. In: DeHaan RL, et al (Eds): Organogenesis. Plenum Press, New York, 219—251, 1965.
- 8) Sandler D, Mancuso A, Becker T, Zori R, Hellrung J, Silverstein J, et al: Association of anophthalmia and esophageal atresia. Am J Med Genet 59: 484—491, 1995.
- 9) Waters BL, Allen EF, Gibson PC, Johnston T: Autopsy findings in a severely affected infant with a 2q terminal deletion. Am J Med Genet 47: 1009—1103, 1993.
- 10) Mann I: Developmental Abnormalities of the Eye. 2nd ed, British Medical Association, London, 1957.
- 11) 白井正一郎: 眼瞼の先天異常. 中島 章, 他(編): 眼科診療 Questions & Answers, 追録第14号, 六法出版社, 東京, 4—7, 1994.
- 12) 村上氏廣, 亀山義郎: 形態学的研究法. 村上氏廣, 他(編): 出生前の医学, 第2版, 第5章, 医学書院, 東京, 575—611, 1976.
- 13) Johnston MC: The neural crest in abnormalities of the face and brain. In: Bergsma D (Ed): Birth Defects, Vol XI, 7. Alan R, New York, 1—18, 1975.
- 14) Noden DM: Periocular mesenchyme: Neural crest and mesodermal interactions. In: Duane TO, et al (Eds): Biomedical Foundation of Ophthalmology. Vol 1. Anatomy, Embryology and Teratology, Chap 3. Harper & Row, Philadelphia, 1—23, 1983.
- 15) Osumi-Yamashita N, Eto K: Mammalian cranial neural crest cells and facial development. Development Growth & Differentiation 32: 451—459, 1990.