

Nanophthalmos 眼強膜におけるコラーゲン線維

福地 健郎¹⁾, 阿部 春樹¹⁾, 澤口 昭一²⁾

¹⁾新潟大学医学部眼科学教室, ²⁾琉球大学医学部眼科学教室

要 約

目 的: Nanophthalmos 眼の強膜を透過型電子顕微鏡で観察し, 特にコラーゲン線維の形態について検討した。

方 法: 観察した nanophthalmos 眼 3 例はいずれも uveal effusion を合併した症例で, 強膜開窓術を行われた際に強膜組織を採取した。採取した強膜は 3% グルタル 2.5% パラフォルムアルデヒドで固定し, 型のごとくエボン包埋, 超薄切片を作製して, 透過型電子顕微鏡によって観察した。コラーゲン線維の直径と単位面積当たりの密度を計測し, 対照眼と比較した。

結 果: いずれの症例でも強膜のコラーゲン線維束による層状構造は極めて不明瞭であった。また, ごく僅かで

はあるが, コラーゲン線維のねじれ, ほつれ, 屈曲などの異常所見があった。コラーゲン線維の密度と直径を計測したが, 大部分の領域ではいずれも対照眼との間に明らかな差はなかった。

結 論: Uveal effusion を合併した強膜において, コラーゲン線維束の層状構造に異常があるが, 大部分のコラーゲン線維そのものの形態は対照眼との間に明らかな差はなかった。(日眼会誌 104: 706—710, 2000)

キーワード: Nanophthalmos, 強膜, 電子顕微鏡, コラーゲン線維, 形態計測

Collagen Fibrils in Nanophthalmic Sclerae

Takeo Fukuchi¹⁾, Haruki Abe¹⁾ and Shoichi Sawaguchi²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Ryukyu University Faculty of Medicine

Abstract

Purpose: To examine collagen fibrils in 3 nanophthalmos sclerae and to compare them with normal control sclerae morphometrically.

Materials and methods: Three cases of nanophthalmos associated with uveal effusion were studied. When sclerectomy was performed, scleral specimens were collected and fixed with 3% glutaraldehyde/2.5% paraformaldehyde. After epon-embedding and ultrathin sectioning, they were examined by transmission electron microscopy. Collagen fibrils from both nanophthalmos and normal control sclerae were compared in diameters and numbers per μm^2 areas.

Results: All scleral tissues from the three cases were associated with irregularly woven and unclear

collagen bundles. Several abnormal findings, such as twisting or fraying, were also detected in a few collagen fibrils. The diameter and density of normal-appearing collagen fibrils that occupied most areas of nanophthalmos sclerae were the same as those from normal control sclerae morphometrically.

Conclusions: Although nanophthalmos sclerae even with uveal effusion showed thick irregular collagen bundles and a few abnormal collagen fibrils, most collagen fibrils appeared the same as normal controls. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 706—710, 2000)

Key words: Nanophthalmos, Sclera, Electron microscopy, Collagen fibril, Morphometry

I 緒 言

Nanophthalmos¹⁾²⁾は, 比較的稀な先天性眼異常で, 小眼球, 高度の遠視, 浅前房, 強膜の肥厚, 緑内障や uveal

effusion の合併などの特徴を持っている。特に uveal effusion に関しては強膜の肥厚による脈絡膜循環の異常が原因の一つとして考えられており, これに強膜を構成するコラーゲン線維やグリコプロテイン, プロテオグリカ

別冊請求先: 951-8510 新潟市旭町通 1—757 新潟大学医学部眼科学教室 福地 健郎

(平成 12 年 1 月 18 日受付, 平成 12 年 4 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Fukuchi, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahi-machi, Niigata 951-8510, Japan

(Received January 18, 2000 and accepted in revised form April 25, 2000)

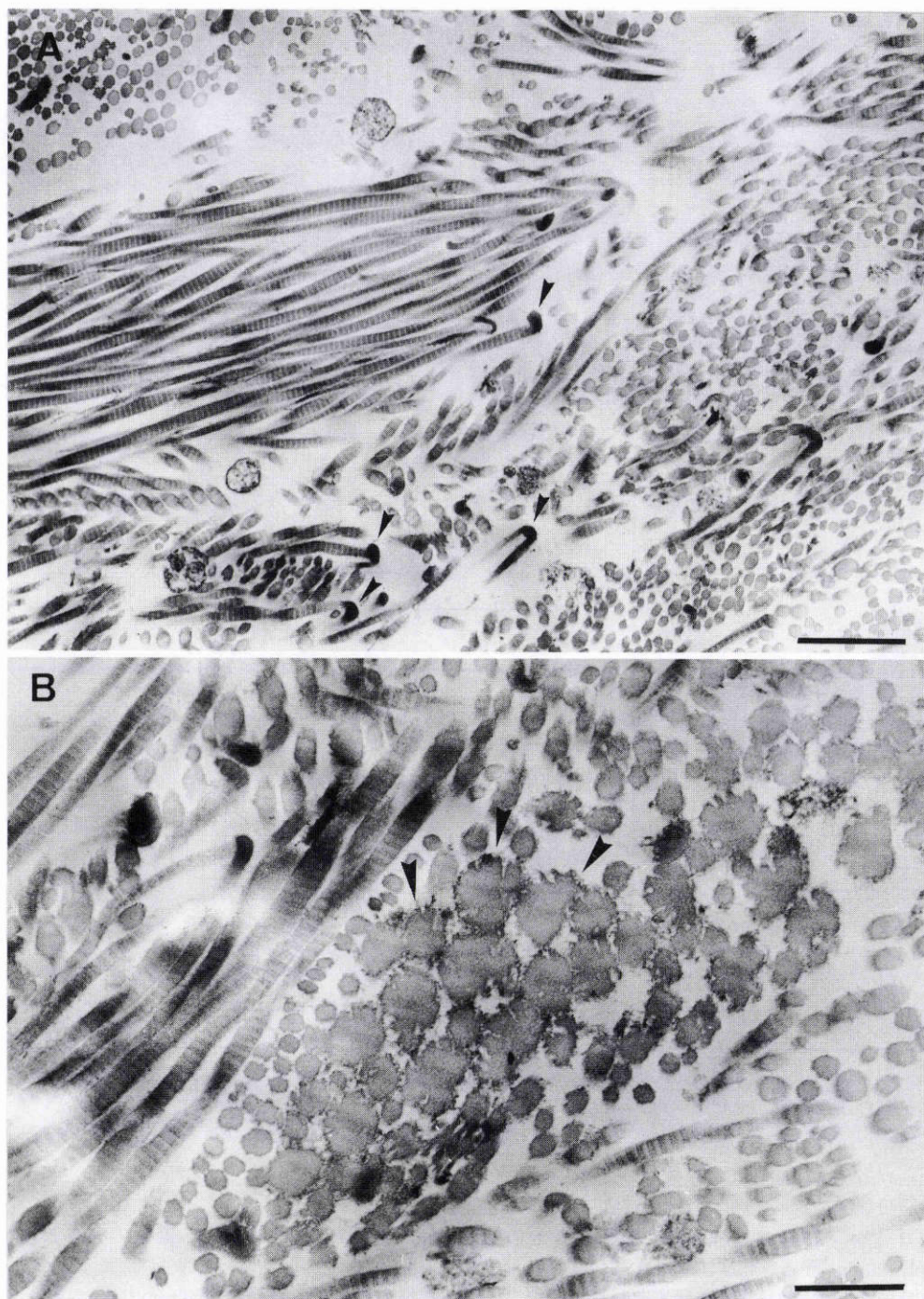


図 1 透過電顕によって nanophthalmos 眼の強膜にあった異常所見.

A: 症例 1. Twisted within bundle と呼ばれるコラーゲン線維末端の屈曲がある (矢じり). 層状構造が不明瞭で縦走する線維と横走する線維が混在する部はある (矢じり). パーは $1.0\ \mu\text{m}$

B: 症例 2. 異常に拡大したコラーゲン線維の断面がある (矢じり). これらは縁が不規則で、縦断面ではしばしば線維がほつれようにみえる (矢). パーは $0.5\ \mu\text{m}$

ンの異常が関与している可能性が推定されている^{3)~8)}. 我々も本症に伴った uveal effusion の 1 例に強膜開窓術を行い、その際に得られた強膜組織を透過型電子顕微鏡 (以下、透過電顕) で観察し、強膜に異常なコラーゲン線維があること、また、銅色素であるキュプロリニックブルー (以下、CB) 染色を行い、硫酸化プロテオグリカンのフィラメントが減少していたことを報告⁸⁾した. 今回の研究

ではさらに別の 3 例について、透過電顕レベルで観察し、特にコラーゲン線維の形態に注目して検討した.

II 対象と方法

3 例の nanophthalmos の強膜片は uveal effusion に対する強膜開窓術の際に得られた. 術式は既報⁸⁾に述べたのとはほぼ同様に行い、強膜片は赤道部から採取した. 症例

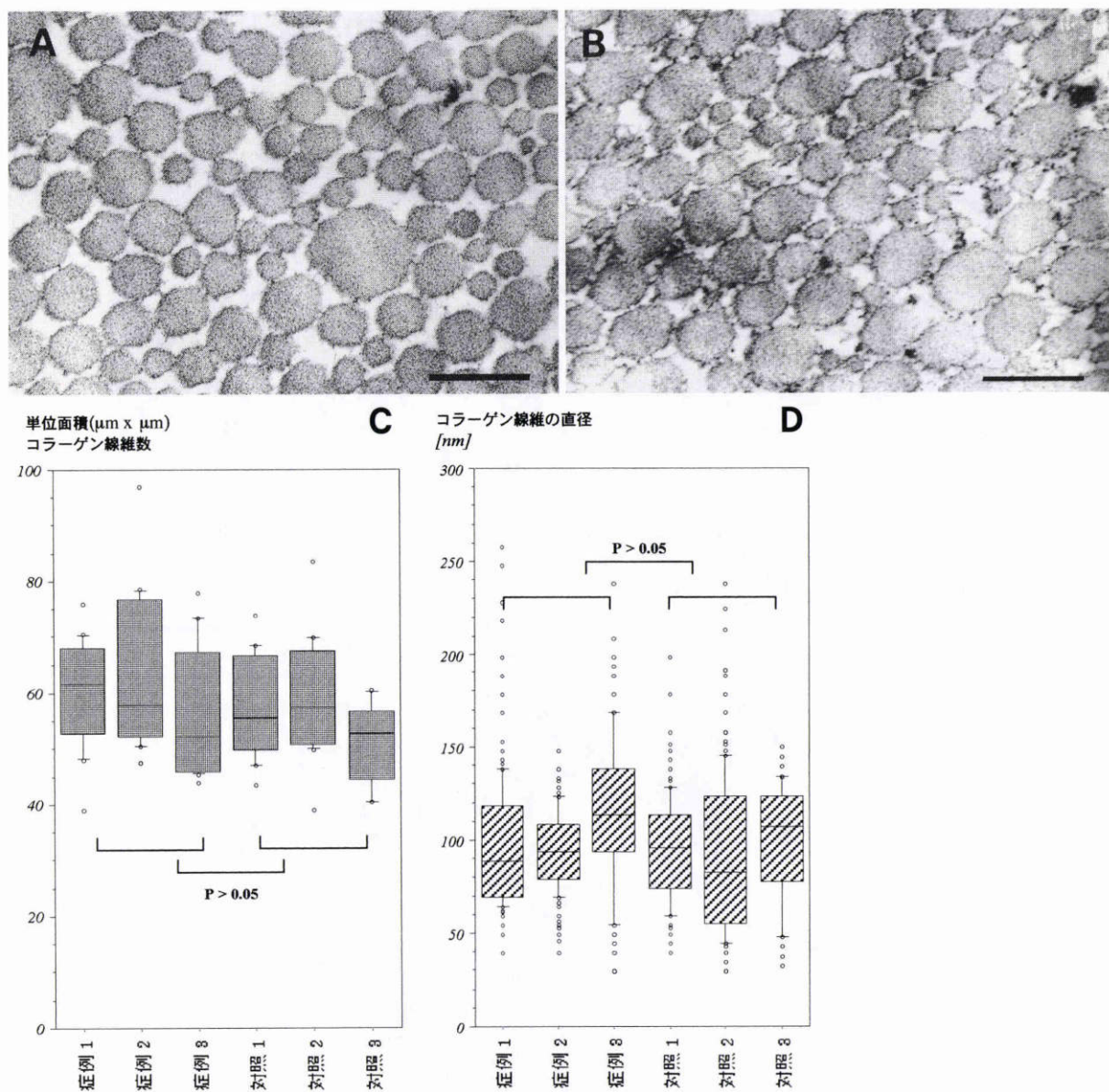


図 2 形態計測の結果。

A : Nanophthalmos 眼強膜・症例 1 の透過電顕写真。バーは 0.5 μm

B : 対照眼強膜・対照 1 の透過電顕写真。バーは 0.5 μm

C : コラーゲン線維の密度。透過電顕写真上の 1 μm^2 内に含まれるコラーゲン線維の数を計測した。Nanophthalmos 群と対照群に統計学的に有意差はなかった。単位：本/ μm^2

D : コラーゲン線維の直径。透過電顕写真上のコラーゲン線維の短径を計測した。Nanophthalmos 群と対照群に統計学的に有意差はなかった。単位：nm

の年齢、性別は、症例 1 が 45 歳、女性、症例 2 が 58 歳、男性、症例 3 が 37 歳、女性であった。対照眼として脈絡膜悪性黒色腫で眼球摘出術が行われた 3 例の眼球の赤道部強膜を用いた。対照眼の年齢、性別は、54 歳、女性、64 歳、男性、46 歳、男性であった。

強膜開窓術で得られた標本は 3% グルタル 2.5% パラホルムアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.2) で一昼夜、固定した。さらに小片に細切し、同様に固定液で 3 時間、固定した。続いて 4% 四酸化オスミウム (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.2) で 3 時間、後固定した。エタノール系列で脱水、酸化プロピレンで置換、エポン包埋した。光

学顕微鏡観察のために厚さ 1 μm の切片を作製し、4% トルイジンブルーで染色した。厚さ 0.08~0.1 μm の超薄切片を作製し、クエン酸鉛および酢酸ウランの二重染色を施し、日立 H-7000 型透過型電子顕微鏡で観察した。

形態計測としては、コラーゲン線維の単位面積当たりの密度とコラーゲン線維の直径を計測し、正常眼と nanophthalmos 眼で比較した。①コラーゲン線維の単位面積当たりの密度の測定には、コラーゲン線維束を横断するように撮影した倍率 40,000 倍の透過電顕写真を用いた。各標本について、ランダムに少なくとも写真 10 枚を取り出し、それぞれから 2 もしくは 3 視野を選択した。1 μm^2

内のコラーゲン線維数をカウントし、それぞれ平均値および標準偏差を求めた。②コラーゲン線維の直径は同じくコラーゲン線維束を横断するように撮影した倍率 60,000 倍の透過電顕写真を用いた。各標本について、ランダムに少なくとも写真 10 枚を取り出し、それぞれからランダムに 20 本のコラーゲン線維を選択した。それぞれの短径を測定し、それぞれの平均値および標準偏差を求めた。統計学的分析は unpaired t-test によって行い、 $p < 0.05$ によって有意と判定した。ごく稀にみられる図 1 B のような異常な形態を伴ったコラーゲン線維の領域は計測から除いた。

III 結 果

3 例の nanophthalmos 眼の強膜を透過電顕によって観察した。正常対照眼強膜ではコラーゲン線維束が規則正しい層状構造を構成しているのに対して、nanophthalmos 眼ではいずれの例でも層状構造のが極めて不明瞭であった。それぞれの層板は不規則で横走する線維束中に突然、縦走する線維が出現するような所見が多かった。また、稀ではあるがいずれの例でも所々に異常なコラーゲン線維が発見された(図 1 A, B)。その所見として、症例 1 では大小不同の著しい部位があり、twisted within the bundle と呼ばれるコラーゲン線維の特徴的な屈曲があった(図 1 A)。症例 2 および 3 では、主に横断面の周囲が不規則な形態を示したものや、縦断面ではコラーゲン線維の分岐がある、いわゆる splitting や fraying の所見があった(図 1 B)。いずれの例でも、以上のような所見があるものの、全体からみると量的にきわめて僅かであって、大部分は大小不同にばらつきがある例もあったものの、形態学的には対照眼の強膜のものと明らかな差のないコラーゲン線維で占められていた。

コラーゲン線維の密度と直径について計測し、対照眼の強膜と比較した。透過電顕写真上(図 2 A, B)、対照眼の強膜におけるコラーゲン線維は $1 \mu\text{m}^2$ 当たり 56.4 ± 9.82 (平均値 $\pm$ 標準偏差) 本に対して、nanophthalmos 眼では 59.4 ± 12.22 本で、統計学的に有意差はなかった($p = 0.32$) (図 2 C)。また、コラーゲン線維の直径に関しては、対照眼では 102 ± 33.8 (平均値 $\pm$ 標準偏差) nm に対して、nanophthalmos 眼では 95.7 ± 34.4 nm と若干細い傾向があったが、同様に統計学的に有意差はなかった($p = 0.38$) (図 2 D)。異常なコラーゲン線維のある領域はごく僅かで、数が限られていたため形態計測は行わなかった。

IV 考 按

これまでに nanophthalmos 眼の強膜を透過電顕によって観察した研究がいくつかある^{3)4)6)~8)}。特にコラーゲン線維の形態について注目した場合には、以下のような所見が報告されている。Yue ら⁴⁾は“twisted within bundle” と呼ばれるコラーゲン線維のねじれがあることを報告し

た。また、Stewart III ら⁶⁾は 10 例の nanophthalmos 眼強膜を観察し、7 眼に異常があり、その所見としては直径の大小不同が著しいこと、コラーゲン線維の末端で細線維にはつれていくような所見(fraying)や、細かく裂かれたようなコラーゲン線維(splitting)や直径 10~35 nm とごく細いコラーゲン線維の集積があるなどを報告している。我々の既報⁸⁾でも一部でコラーゲン線維の大小不同の著しい部位があり、この部ではコラーゲン線維の fraying や splitting の所見や、縦走する線維の間に突然、横走する線維が出現するなどの異常所見があることを報告した。また、Trelstad ら³⁾の報告では詳細には述べられてはいないが、透過電顕写真からみると、我々の所見と同様に走行異常を示すコラーゲン線維がある。今回、新たな 3 例を調べたが、症例 1 では主に twisted within bundle の所見が、症例 2, 3 ではコラーゲン線維の大小不同や fraying や splitting の所見があり、これまでに示された所見と一致している。しかし、いずれの例でもこのような異常なコラーゲン線維は得られた強膜全体からすると、ごく一部であって、大部分のコラーゲン線維は対照眼のものと差がないように思われた。そこで、コラーゲン線維の密度と直径について、形態計測によって比較した。図 2 に各 3 例の結果を示したが、直径に関して nanophthalmos 眼の症例 1 や 3 で直径の大小不同が大きい傾向があったが、症例 2 ではむしろ小さく、平均では密度、直径のいずれにも統計学的に有意差はなかった。Stewart III ら⁶⁾の報告で、直径に関して 30~320 nm とより大小の差が大きかったが、コラーゲン線維にみられる周期や明暗帯には明らかな差はなかったと報告している。また、Trelstad ら³⁾は生化学的 hydroxyproline と proline, hydroxylysine と lysine, hydroxylysine と hydroxyproline の比を調べたが、正常対照眼との間に明らかな差はなかったと報告している。明らかに異常なコラーゲン線維に関しては今回の検討から除いた。その理由としては、ごく稀な異常なコラーゲン線維を統計に含むことで異常な部位の計測結果を過剰に評価してしまう危険性を考えたためである。したがって、今回の計測結果には「大部分を占めるコラーゲン線維に関して」という条件が付く。Nanophthalmos 眼の強膜を透過電顕的に観察すると、多くの例で異常なコラーゲン線維が検出されている。しかし、それらはいずれも全体に対する比はきわめて僅かである。Stewart III ら⁶⁾の報告で異常のなかった 3 例も、発見できなかったという可能性もある。これらから考えると、おそらく nanophthalmos 眼であっても大部分を占めるコラーゲン線維の性状は、少なくとも形態学的、生化学的分析上、正常眼のものと明らかな差がない可能性が高い。

ところで、今回の 3 例に共通で、最も特徴的な所見といえるものはコラーゲン線維束によって構成される層状構造がきわめて不明瞭であった点である。これは Trelstad ら³⁾の報告の偏光顕微鏡による所見や既報⁸⁾でも示され

ている。今回の対照眼でもそうであったように、正常眼の強膜は整然とコラーゲン線維束による層状構造が構成されており、コラーゲン線維も整然と配列し、直径も比較的均一である。それに対して nanophthalmos 眼強膜は全体に厚いだけでなく、層状構造が不明瞭で、構造上の成熟度が低いと考えられる。異常なコラーゲン線維の意味や、それらを生ずるメカニズムは明らかではないが、構造上の成熟度が低い点と何らかの関係があるかも知れない。しかし、この異常なコラーゲン線維を含む部位は全体からするとごく僅かで、これが uveal effusion などの合併症のメカニズムに直接関与する可能性は少ないと考えられる。一方、層状構造が不明瞭な点は強膜の水透過性や、その方向などに影響を与えると考えられ、合併症の発症に関与している可能性がある。Yue ら⁵⁾はフィブロネクチンが増加していることを生化学的、組織化学的に示しており、またプロテオグリカンが変化していることを示した報告^{3) 8) ~ 10)}もいくつかある。我々も既報⁸⁾で硫酸化プロテオグリカンが減少している可能性について報告した。今回の症例について CB 染色と酵素消化法を併用し、組織化学的性状について検討したところ、興味深い結果が得られている。続報で報告の予定である。

文 献

- 1) Brockhurst RJ: Nanophthalmos with uveal effusion. A new clinical entity. Arch Ophthalmol 93: 1289—1299, 1975.
- 2) Brockhurst RJ: Vortex vein decompression for nanophthalmic uveal effusion. Arch Ophthalmol 98: 1987—1990, 1980.
- 3) Trelstad RL, Silbermann NN, Brockhurst RJ: Nanophthalmic sclera. Ultrastructural, histochemical, and biochemical observations. Arch Ophthalmol 100: 1935—1938, 1982.
- 4) Yue BYJT, Goldberg MK, Puck A, Duvall J, Tso MOM, Sugar J: Nanophthalmic sclera. Morphologic and tissue culture studies. Ophthalmology 93: 534—541, 1986.
- 5) Yue BYJT, Kurosawa A, Goldberg MK, Duvall J, Tso MOM, Sugar J: Nanophthalmic sclera. Fibronectin studies. Ophthalmology 95: 56—60, 1988.
- 6) Stewart III DH, Streeten BW, Brockhurst RJ, Anderson DR, Hirose T, Gass JD: Abnormal scleral collagen in nanophthalmos. An ultrastructural study. Arch Ophthalmol 109: 1017—1025, 1991.
- 7) Yamani, A, Wood I, Sugino I, Wanner M, Zarbin MA: Abnormal collagen fibrils in nanophthalmos: A clinical and histologic study. Am J Ophthalmol 127: 106—107, 1999.
- 8) 福地健郎, 沢口昭一, 本田徳弼, 斎藤達也, 飯塚裕子, 岩田和雄, 他: Nanophthalmos の一例の強膜に見られたプロテオグリカンの異常について. 日眼会誌 97: 260—267, 1993.
- 9) Shiono T, Shoji A, Mutoh T, Tamai M: Abnormal sclerocytes in nanophthalmos. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 230: 348—351, 1992.
- 10) Kawamura M, Tajima S, Azuma N, Katsura H, Akiyama K: Immunohistochemical studies of glycosaminoglycans in nanophthalmic sclera. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234: 19—24, 1996.