

正常ラット角膜に認められた Subepithelial Deposits について (図10, 表2)

中 安 清 夫 (順天堂大学医学部眼科学教室)

Spontaneously Developing Subepithelial Deposits in SD Rat Cornea

Kiyoo Nakayasu

Department of Ophthalmology Juntendo University School of Medicine

要 約

何ら実験的処置のなされていない正常と考えられるSDラット角膜に、Subepithelial depositsを高頻度で観察した。月齢の若いラットのDepositsは、上皮基底膜の結節状の隆起部分に観察され、ラットの月齢が進むにつれ、角膜の加齢変化と思われる上皮基底膜の肥厚に伴ってその出現頻度を増し、その大きさも増大していた。光学及び電子顕微鏡を用いた組織学的観察並びにX-ray microanalyzerによる分析から、このDepositsがリン酸カルシウムを含有する物質であることを確認した。以上の結果より、ラット角膜のカルシウム沈着に上皮基底膜の加齢変化が重要な役割を果たしていると推測された。(日眼 92:1021—1028, 1988)

キーワード：角膜、カルシウム沈着、角膜上皮基底膜、加齢変化、ラット

Abstract

Spontaneously developing deposits in the subepithelial layer in the central cornea of SD rats were observed in accordance with aging. The subepithelial deposits in the earliest stage of development were always situated in the region of the nodular shaped accumulation of basement membrane-like material between the pre-existing basal lamina and the epithelial basal cell. The incidence and the severity of the subepithelial deposits increased with age. Histological studies and X-ray microanalysis reveal that phosphated calcium was contained in the subepithelial deposits. These observations suggest that corneal calcification occurs spontaneously in SD rat without any experimental treatment and that the aging change of the epithelial basement membrane might play an important role in corneal calcification. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1021—1028, 1988)

Key words: Cornea, Calcification, Epithelial basement membrane, Aging change, Rat

I 緒 言

ヒト角膜におけるカルシウム（以下Ca）の沈着は、遷延性の角膜実質疾患や虹彩ぶどう膜炎、絶対緑内障、高Ca血症などの疾患に合併する带状角膜変性として広く知られている¹⁾。一方、実験動物においても糖尿病

ラットにおける角膜病変の一つとして、Ca沈着と思われるSubepithelial depositsを指摘する報告²⁾³⁾がある。

今回、著者は何ら実験的処置を加えていない正常と考えられるSDラットの角膜においても高頻度にSubepithelial depositsを観察し、光学及び電子顕微鏡

別刷請求先：113 東京都文京区本郷3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 中安 清夫 (昭和63年2月5日受付)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Dept. of Ophthalmol., Juntendo Univ. School of Med.

3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Accepted for publication February 5, 1988)

を用いた組織学的観察並びに X-ray microanalyzer を用いた検索により, Subepithelial deposits がリン酸カルシウムを含有する物質であることを確認した。

角膜における Ca 沈着の発生病理について, 未だ十分な解明がなされているとは言い切れず, 上記ラット角膜の詳細な検索は角膜 Ca 沈着の発生病理解明の一助と考えられるのでここに報告する。

II 実験動物及び方法

実験には月齢0.5, 2, 10, 24カ月の両性 SD ラット (Taconic Farm, Charles River Breeding Lab.) の眼球141眼を使用した。上記ラットのうち, 0.5カ月及び2カ月のラットは購入直後に実験に供したが, その他のラットはそれぞれの月齢に達するまで通常の動物舎内の金属性飼育カゴ中で, Open formula NIH 31 Diet にて飼育した。各々の月齢に達したラットの眼球は実体顕微鏡にて角膜を観察した後, 摘出し強角膜片とした。4%Glutaraldehyde にて固定した後, 一部の SD ラット強角膜片は光学顕微鏡観察用に Ethanol 脱水し Glycol methacrylate にて包埋した。又, 他の強角膜片は, 電子顕微鏡用に 2%四酸化 Osmium にて後固定した後, 通常の方法で Epon 包埋した。

光学顕微鏡用の組織切片は, Toluidine blue, Periodic acid Schiff (PAS), Von Kossa 法にて染色, 検鏡した。電子顕微鏡用の超薄切片は, Uranyl acetate 及び Lead citrate にて電子染色した後, JEOL 100C 電子顕微鏡 (日本電子) にて観察した。X-ray microanalysis 用には, 約4 μ m の Glycol methacrylate 包埋切片をクウォーツスライドガラス上にのせカーボンコーティングした後, X-ray microanalyzer (Cameca, France) にて分析した。

III 結 果

1. 実体顕微鏡及び光学顕微鏡による観察

角膜の Deposits 沈着は角膜中央部にほぼ円形に分布していた。沈着の強いものは実体顕微鏡のみの観察でも上皮下の点状混濁として十分に確認できたが, 全ての眼球において約1mm 幅の角膜輪部には Deposits 沈着のない正常領域を認めた (図1)。Subepithelial deposits の出現頻度 (表1) は, 月齢0.5カ月のものでは26眼中0眼 (0%), 2カ月のものでは80眼中21眼 (26.3%), 10カ月では23眼中16眼 (69.6%), 24カ月では12眼中12眼 (100.0%) に観察され, χ^2 検定で加齢に伴う明らかな増加傾向を示した ($p < 0.01$)。出現頻度

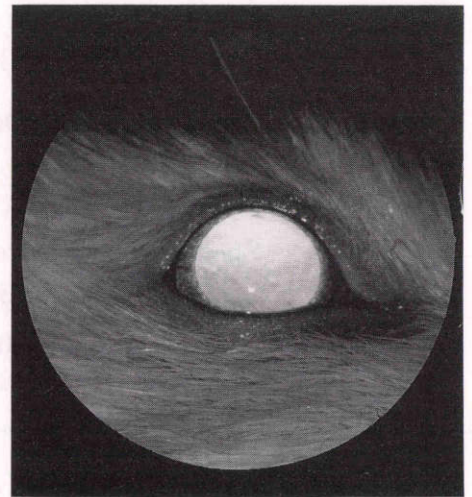


図1 実体顕微鏡写真, 月齢24カ月 SD ラット角膜。沈着の強いものは, 実体顕微鏡による観察でも上皮下に点状混濁を確認できる。×2,0

表1 Subepithelial deposits の出現頻度。加齢に伴う増加傾向を示す。 χ^2 検定の結果, 月齢に伴う陽性率の増加は危険率1%で有意に認められた。

(眼数)

	月齢	Deposits 陽性 (%)
SD ラット	0.5	0/26 (0.0)
	2	21/80 (26.3)
	10	16/23 (69.6)
	24	12/12 (100.0)

の性差は認められなかった。光学顕微鏡による観察では, Subepithelial deposits は上皮基底膜付近に Toluidine blue 染色及び PAS 染色にて濃染される物質として観察された (図2, 3, 4)。これらの Deposits は加齢に伴ってその数を増し Size の点でも大きくなる傾向を示し, 月齢24カ月のものでは上皮基底膜にそって帯状に観察される部位も認められた。又, 一部の Deposits は角膜実質最上層にも観察された。月齢0.5カ月及び2カ月のラット角膜上皮細胞及びその基底膜は, 光学顕微鏡レベルでは異常所見を認めなかったが, 月齢10カ月, 24カ月のものでは, Deposits の局在する部分の上皮基底膜の局所的な肥厚及び上皮基底細胞の Toluidine blue 染色と PAS 染色に対する染色性の低下が観察された。リン酸カルシウムに対する特異染色である Von Kossa 染色法では, Deposits に

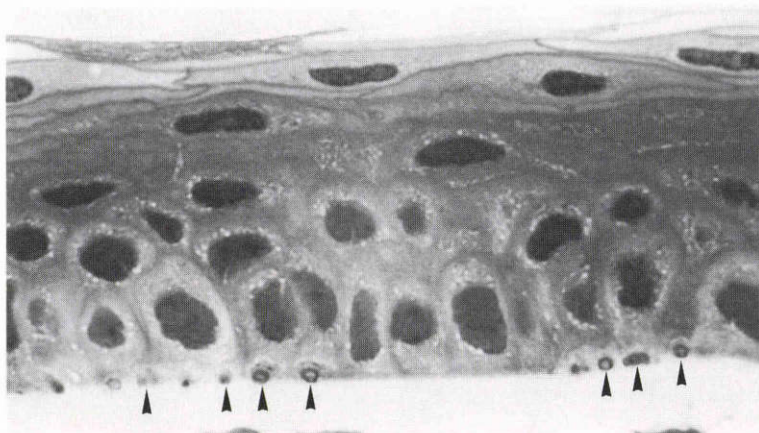


図2 月齢10カ月 SD ラット角膜. Toluidine Blue 染色. 上皮基底膜付近に濃染された Subepithelial deposits (矢印) が観察される. $\times 320$

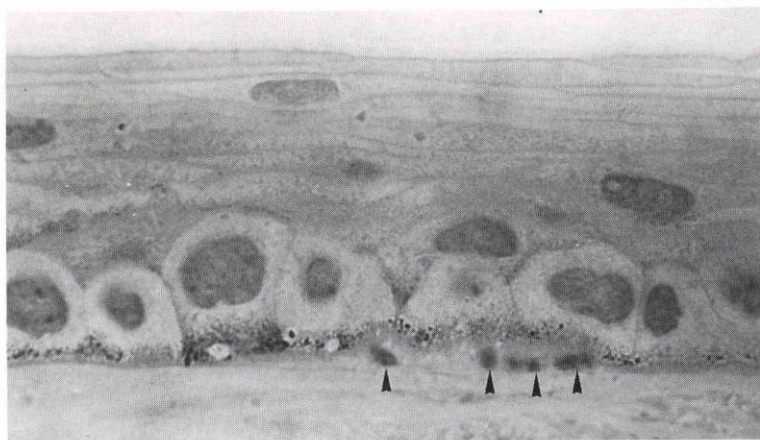


図3 月齢24カ月 SD ラット角膜. PAS 染色. Subepithelial deposits (矢印) は PAS でも濃染される. 上皮基底膜の肥厚及び基底細胞の染色性の低下が観察される. $\times 320$

一致して顆粒状又は帯状に黒色陽性所見が観察された(図5)。

2. 電子顕微鏡による観察

月齢0.5カ月の SD ラット角膜を電子顕微鏡を用いて観察すると(図6), 上皮基底膜の Basal lamina はほぼ一定の厚さを保ち, 発達した Half-desmosome も所々で観察された。上皮基底細胞にも異常所見は認められず, Subepithelial deposits は電子顕微鏡レベルでも観察されなかった。

月齢2カ月の角膜においても(図7), 多くの上皮細胞及びその基底膜は, 0.5カ月のラット角膜のそれと同様, 異常所見は観察されなかった。しかし, 一部の角

膜では, もともと存在していた正常の基底膜と上皮基底細胞との間に新たに産生されたとと思われる基底膜様物質が結節状に蓄積されている所見を認めた。この結節状に突出した基底膜様物質の上に, 円形ないし楕円形の Subepithelial deposits と思われる物質がしばしば観察された。この Deposits は電子密度の高い境界で囲まれていたが, その内側は基底膜とほぼ同程度の電子密度を有していた。しかし, これら基底膜の肥厚及び Deposits の観察される部分においても, 上皮基底細胞の形態学的異常所見は観察されなかった。

月齢10カ月の角膜の観察(図8, 9)では, 上皮細胞と, もともと存在していた基底膜との間に蓄積された



図4 月齢24カ月SDラット角膜, Toluidine Blue 染色, 上皮基底膜上に帯状に濃染する Deposits (矢印) が観察される, 実質前層にも斑状の Deposits (矢印) を認める, $\times 180$

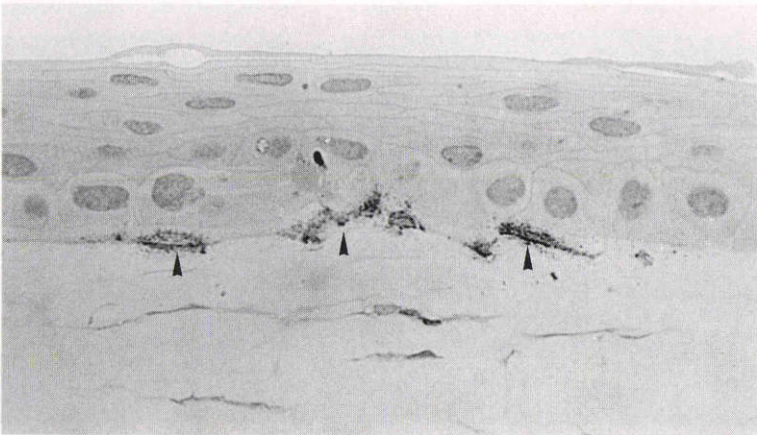


図5 月齢24カ月SDラット角膜, Von Kossa 染色, Subepithelial deposits (矢印) は, 黒色陽性所見を示す, $\times 180$

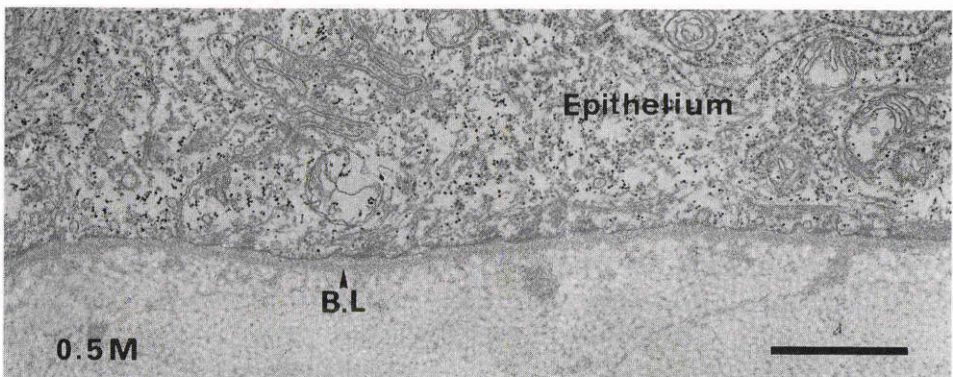


図6 月齢0.5カ月SDラット角膜, 電子顕微鏡による観察でも, 上皮細胞, Basal lamina (B.L.), 実質に異常は認められない, $\times 25,000$

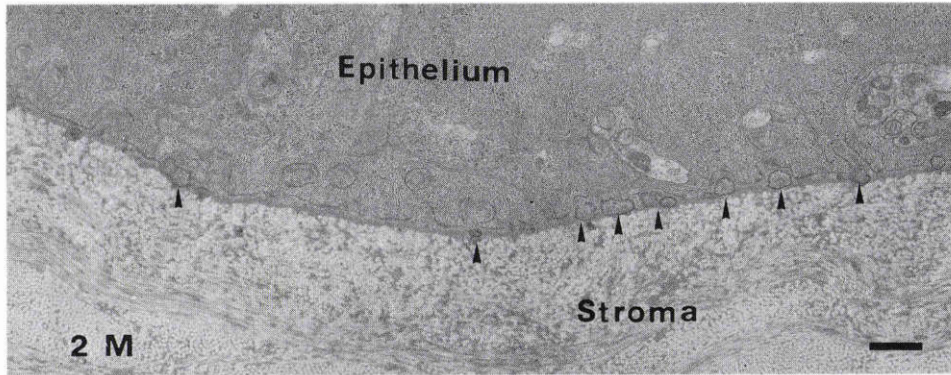


図7 月齢2カ月 SD ラット角膜, ごく初期の Subepithelial deposits (矢印) は, 上皮基底膜が結節状に肥厚した部分に認められる, 上皮基底細胞には異常を認めない, $\times 11,000$

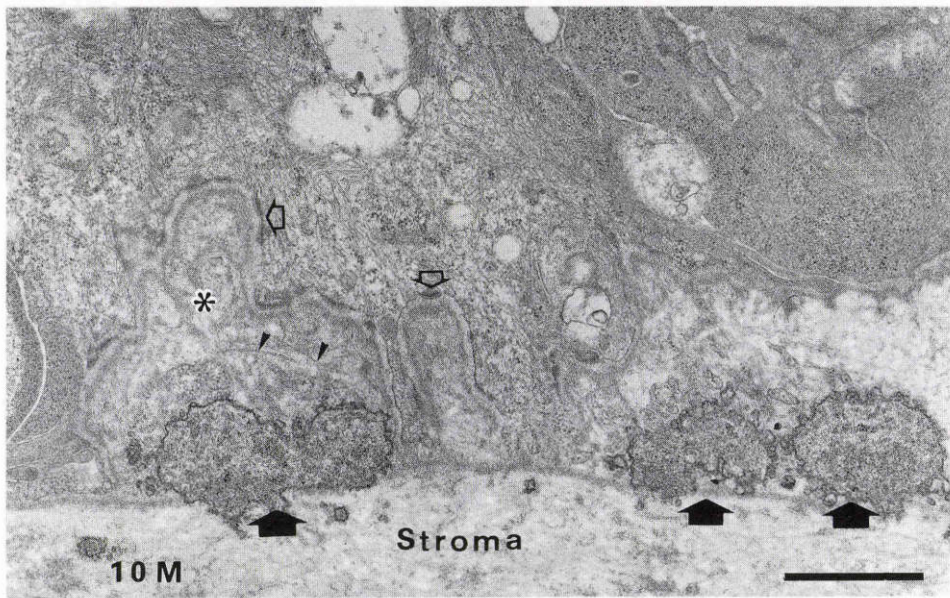


図8 月齢10カ月 SD ラット角膜, 上皮基底細胞と基底膜との間に基底膜様物質(*)が蓄積されており, Bandを有する直径30nmの太い Collagen fibril (小矢印)も観察される, Half-desmosom (白抜き矢印)は, 比較的よく保たれている, Subepithelial deposits (大矢印)は, 電子密度の高い境界で囲まれている, 上皮基底細胞に空胞変性が観察される, $\times 26,000$

結節状の基底膜様物質はその大きさを増し, 多くの部位で融合して新たな厚い基底膜層を形成していた。時に, この部位に Bandを有する直径約30nmの太い Collagen fiber も観察された。基底膜様物質の肥厚とともに Subepithelial deposits も月齢2カ月の角膜のものに比べ大きく, 隣接する2つ又は3つの Deposits が融合している所見や, 大きな Deposits の

周囲に多数のごく小さな顆粒状の Deposits も観察された。又内側に電子密度の高い物質が何層にも重なった Onion ring 状の Deposits も観察された。この時期になると, 比較的小さな少数の Deposits が角膜実質の最前層にも認められた, これら Deposits の存在する部位の上皮基底細胞は多くの場合, 変性・壊死に陥っていた。しかし, 上皮基底細胞と新生された結節状の基

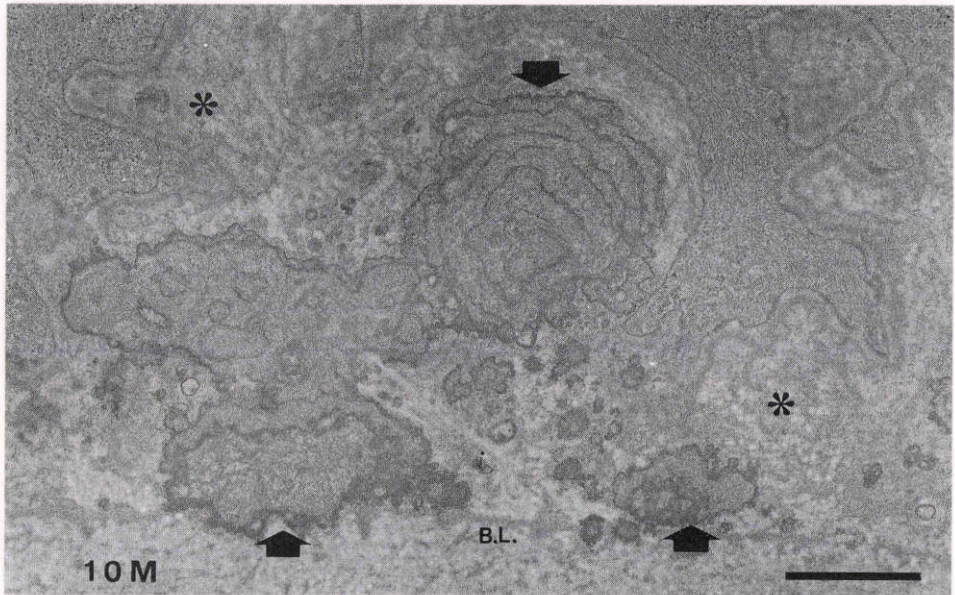


図9 月齢10カ月 SD ラット角膜. Subepithelial deposits (矢印)の中には,内側に電子密度の高い物質が何層にも重なったOnion ring 状の構造を有するものも認められる. *: 基底膜様物質. B.L.: Basal lamina. $\times 26,000$

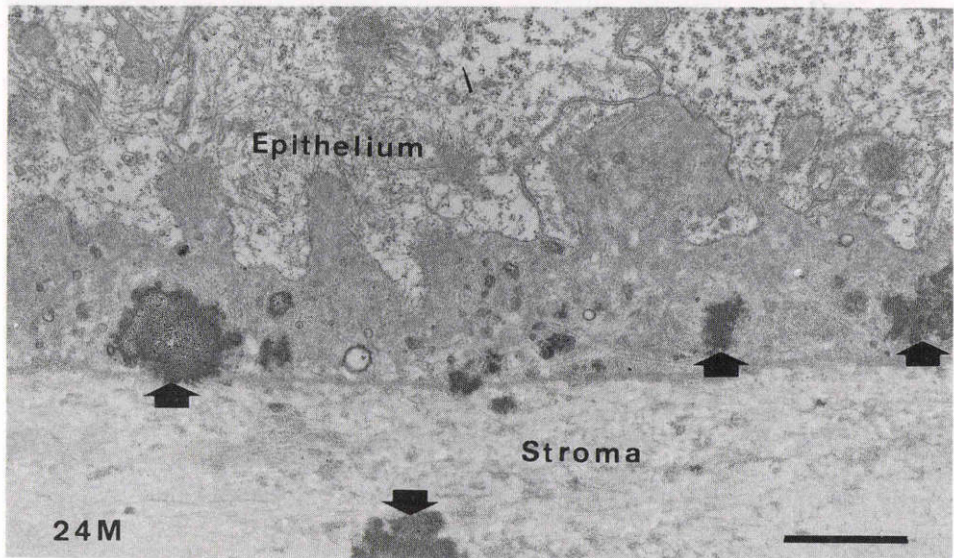


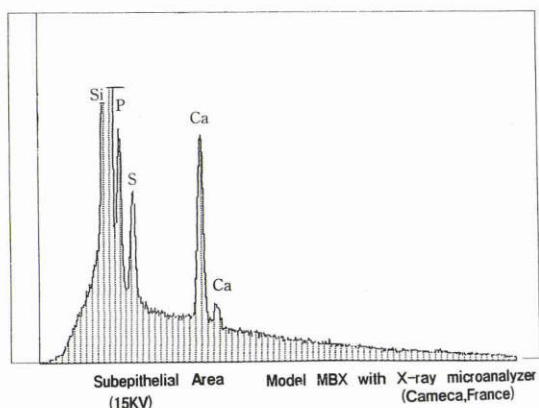
図10 月齢24カ月 SD ラット角膜. 基底膜様物質は層状となり, Subepithelial deposits (矢印)は,電子密度の高いほぼ均一な物質として観察される. 実質前層にも同様の Deposits が認められる. $\times 24,000$

基底膜様物質との間に明らかな Half-desmosome の観察される部分も認められた.

月齢24カ月の角膜(図10)における上皮下の基底膜様物質はさらに肥厚し, Deposits は境界がやや不鮮明

となっていたが,電子密度の非常に高い均一な物質として観察された. 実質前層にも同様の Deposits が認められた. 変性した上皮基底細胞と新生された基底膜様物質の間の Half-desmosome は,ほとんど観察されな

表2 X-ray microanalyzer による分析, Subepithelial deposits に一致した部位から Silicon (Si), Phosphate (P), Sulfur (S) 及び Calcium (Ca) のピークが認められる。



くなっていた。

3. X-ray microanalyzer による検索 (表2)

Subepithelial deposits に一致した部位では Silicon (Si), Phosphate (P), Sulfur (S) 及び Calcium (Ca) にピークを認めた。上皮細胞層及び実質層についての検索では, Si 及び S にのみピークを認め, Ca 及び P のピークは認められなかった。

IV 考 按

正常と考えられる SD ラットの角膜に観察された Subepithelial deposits は, リン酸カルシウムに対する特異染色法である Von Kossa 染色法で黒色陽性所見を示した。又, X-ray microanalyzer による分析では Subepithelial deposits に一致した部位から, Si, S, P 及び Ca の高いピークが観察された。一方, 上皮細胞層及び実質層からは Si 及び S にのみピークを認めている。従って Si 及び S は切片をのせた Slide glass などから由来した非特異的なピークであり, 真に Deposits 由来のピークは P 及び Ca のみと考えられる。さらに電子顕微鏡による観察でも, 従来から言われている Ca 沈着の所見²⁾⁴⁾⁵⁾と前述の所見とはほぼ一致しており, 今回観察された Deposits はリン酸カルシウムを含有した物質でありヒト角膜の帯状角膜変性に認められる Ca 沈着とほぼ同様のものであると結論できる。本研究に用いられた SD ラットは観察前に全く何の実験的処置もなされていない, という点では正常と考えられる。このようなラットの角膜上皮下に観察された Ca の沈着機序を考察することはヒト角膜にお

ける帯状角膜変性の発症病理解明への一助となると思われる。

角膜への Ca 沈着は角膜が長期にわたり病的状態におかれた場合に認められる非特異的な臨床所見としてとらえる事ができる⁶⁾。本研究で用いられたラットは, Germ-free の動物室で飼育されていたわけではなく, Ca 沈着の原因として慢性の角膜感染症や Autotraumaなどを全く否定することはできない。しかし, 組織標本を観察する限り感染性疾患などの明らかな所見は見い出されなかった。組織学的観察において, Ca 沈着以外の特記すべき所見は上皮細胞基底膜の加齢に伴うと考えられる肥厚であろう。上皮基底膜の肥厚は糖尿病の際にも認められる所見⁷⁾であるが, 単なる加齢変化のみでもかなりの肥厚を示すものと考えられている。Alvarado ら⁸⁾は, ヒト角膜上皮細胞基底膜の加齢に伴う肥厚は出生時より70歳までに数倍から10倍にも達することを示している。今回観察した SD ラット群においても, 月齢2カ月のラットでは, 上皮細胞基底膜の肥厚は局所的で, ごく小さな結節状の隆起として観察されたが, 月齢が進むに従って基底膜の隆起はその厚さ・大きさを増し, 月齢24カ月ラットのそれは層状を呈していた。基底膜肥厚の認められる部位の上皮基底細胞は, 月齢2カ月のものでは形態学的に異常所見を認めなかったが, 月齢10カ月, 24カ月のものでは明らかな変性・壊死像がしばしば観察された。注目すべきは初期の Ca 沈着が必ずこの上皮細胞基底膜の結節状の肥厚部分に認められた点である。月齢2カ月, 10カ月のラット角膜に認められた Deposits は光顕レベルでは PAS 染色, Toluidine blue 染色で濃染されており, 電顕レベルでの Deposits は, 電子密度の高い物質で囲まれてはいるもののその内部の電子密度は基底膜とほぼ同様であった。さらに月齢が進むに従って基底膜の肥厚が著明になるとともに, Ca 沈着の頻度も高く Deposits 自体の大きさも大きくなっていた。これらの事から, Ca が角膜に沈着する初期の段階では, Mucopolysaccharide などの基底膜成分が Ca 沈着の Core として重要な役割を果たしているように思われる。そして, 沈着の進行にともなって Core として存在していた基底膜成分が徐々に Ca に置き換わっていくのではないかと考えられる。以上の所見より今回観察したラット角膜の Ca 沈着は, 上皮基底細胞及びその基底膜の加齢変化が直接の引き金であろうと推測した。O'Conner⁹⁾も角膜 Ca 沈着に上皮基底膜が重要な役割を果たしていることを指摘している。又,

Obenberger⁹⁾らは間質に存在する Sulfated mucopolysaccharide の量的低下が Ca 沈着を促進するのではなかと述べており、基底膜内の Sulfated mucopolysaccharide 量が老化によって低下していることも考えられる。

一般に、Ca の組織内沈着は pH の局所的な上昇の際に出現すると考えられている。角膜においては、もともと角膜実質深層での糖代謝は嫌気性解糖が主で乳酸の蓄積が起りやすく、角膜表層の pH は深層に比べ相対的にやや大きくなっている¹⁰⁾。さらに、角膜表層での水分⁶⁾¹¹⁾炭酸ガス⁶⁾の蒸発が加わり、角膜上皮層及び実質前層の pH が上昇すると一層 Ca 沈着の起りやすい環境を作ると考えられている。上皮基底細胞や基底膜の老化に伴う変化が直接水分や炭酸ガスの蒸発を促進させているかどうかは不明であるが、pH を上昇させる何らかの機序が働いているものと考えられる。ヒト角膜带状変性の際角膜輪部には Ca 沈着が起りにくいと同様、今回観察したラット角膜においても約 1mm 幅の角膜輪部には、Ca 沈着は認められなかった。この理由としては、ヒト角膜带状変性の場合と同様、強結膜輪部血管の循環系による Buffer 効果の為⁶⁾と考えてよいように思われる。

以上、SD ラット角膜において、老化によると推測される上皮下の Ca 沈着について報告したが、一方糖尿病ラット²⁾³⁾の角膜においても今回と同様の Subepithelial deposits の存在を指摘する報告がある。糖尿病における上皮基底膜の肥厚は、老化による変化にも増してよく認められる所見⁷⁾であり、その意味では、Ca 沈着の頻度も正常のそれと比べて大きくなるものと予想される。しかし今回指摘したように、ラット角膜を用いた長期実験においては、単なる老化のみでもかなりの高頻度で上皮下に Ca 沈着が認められることを念頭に置く必要があると思われる。

本研究の一部は米国 NIH, NEI で行なわれた。御指導、

御校閲いただいた中島章教授および御教示いただいた Dr. Toichiro Kuwabara に深謝いたします。

文 献

- 1) Elder DS: System of Ophthalmology. Vol 8. Diseases of the Outer Eye. Part 2, Cornea and Sclera. 893—902, Henry Kimpton, London, 1965.
- 2) Friend J, Ishii Y, Thoft AR: Corneal epithelial changes in diabetic rats. Ophthalmic Res 14: 269—278, 1982.
- 3) Mittl R, Galin AM, Opperman W, et al: Corneal calcification in spontaneously diabetic mice. Invest Ophthalmol 9: 137—145, 1970.
- 4) 金井 淳, 山口達夫, 中島 章: 元素分析電子顕微鏡による角膜及び結膜色素沈着の研究. その 4. 带状角膜変性. 日眼 82: 77—84, 1978.
- 5) Cursino WJ, Fine SB: A histologic study of calcific and moncalcific band keratopathies. Am J Ophthalmol 82: 395—404, 1976.
- 6) O'Connor GR: Calcific band keratopathy. Tr Amer Ophthal Soc 70: 58—81, 1972.
- 7) Taylor RH, Kimsey AR: Corneal epithelial basement membrane changes in diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 548—553, 1981.
- 8) Alvarado J, Murphy C, Juster R: Age-related changes in the basement membrane of the human corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1015—1028, 1983.
- 9) Obenberger J, Cejkova J, Brettschneider I: Experimental corneal calcification, A study of acid mucopolysaccharides. Ophthal Res 1: 175—186, 1970.
- 10) Kinoshita JH: Some aspects of carbohydrate metabolism of the cornea. Invest Ophthalmol 1: 178—186, 1962.
- 11) Doughman DJ, Ingran JJ, Bourne WM: Experimental band keratopathy. Electron microprobe X-ray analysis of aqueous and corneal calcium concentrations. Invest Ophthalmol 9: 471—475, 1971.