

円錐角膜の実質コラーゲン線維に関する定量的分析

高橋 明宏*, 中安 清夫*, 沖坂 重邦*, 金井 淳**

*防衛医科大学校眼科学教室, **順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

円錐角膜の実質菲薄化と直接的な原因を検索する目的で、本疾患の角膜実質コラーゲン線維を光学および電子顕微鏡を用いて組織学的に観察した。対象は角膜移植時に得られた18歳から35歳の円錐角膜13眼である。また対照角膜としての網膜芽細胞腫1眼、悪性黒色腫2眼の角膜(13, 35, 50歳)を用いた。円錐角膜中央部の実質細胞密度は対照角膜との間に有意差はなく、角膜全体の細胞数は実質厚の菲薄化の分だけ対照角膜に比べ減少しているものと思われた。コラーゲン薄葉の総数は円錐角膜中央部で 219.3 ± 12.7 であったのに対し、対照角膜では 304 ± 35.0 と円錐角膜で有意に減少していた。また、円錐角膜、対照角膜ともに角膜実質の厚さとコラーゲン薄葉の総数との間には正の相関が認められた(相関直線 $Y = 160.052 \pm 0.27618X$)。各コラーゲン薄葉の厚さは、円錐角膜中央部で $1.41 \pm 0.10 \mu\text{m}$ 、対照角膜中央部で $1.66 \pm 0.11 \mu\text{m}$ と円錐角膜でやや薄かったものの、両者の間に有意な差は認められなかった。以上の結果より、本疾患の角膜実質の菲薄化の直接的な原因は、実質細胞も含めたコラーゲン薄葉の一部が間引きされるためであろうと推測された。(日眼会誌 94: 1068-1073, 1990)

キーワード: 円錐角膜, 実質菲薄化, コラーゲン薄葉, コラーゲン線維

Quantitative Analysis of Collagen Fiber in Keratoconus

Akihiro Takahashi*, Kiyoo Nakayasu*, Shigekuni Okisaka* and Atsushi Kanai**

*Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

**Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

In order to identify the direct pathogenic factors involved in the stromal thinning of keratoconus, quantitative analysis of keratocytes, collagen fibers and collagen lamellae in keratoconus cornea was performed histologically by light and electron microscopy. Both normal and keratoconus corneas showed a similar cell density of keratocytes in the central stroma, therefore the total number of keratocytes in keratoconus cornea might be smaller than that of controls, because of the thinning of stroma in the keratoconus. The collagen lamellae in keratoconus corneas showed a significant decrease in number compared with controls. There was a direct relationship between the stromal thickness and number of collagen lamellae. On the other hand, there was no statistical significance between normal and keratoconus corneas in terms of the thickness of collagen lamellae. These results suggest that the thinning of the cornea in keratoconus might occur as the result of a defect of some collagen lamellae due to a disorganization during the process of collagen lamellae formation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 1068-1073, 1990)

Key words: Keratoconus, Thinning of stroma, Collagen lamella, Collagen fiber

別刷請求先: 359 所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 沖坂 重邦
(平成2年3月30日受付, 平成2年4月24日改訂受理)

Reprint requests to: Shigekuni Okisaka, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

3-2 Namiki, Tokorozawa-shi 359, Japan

(Received March 30, 1990 and accepted in revised form April 24, 1990)

I 緒 言

円錐角膜の病因について、今日まで遺伝子障害、発生的異常、代謝・内分泌障害、自律神経系の異常、機械的刺激など、さまざまな仮説が立てられている。さらに近年、円錐角膜の実質非薄化の直接的な原因として実質コラーゲン線維の産生低下¹⁾・代謝亢進²⁾、型別コラーゲンの変化³⁾、コラーゲン架橋の異常⁴⁾、実質内ムコ多糖類の異常などが指摘されている。しかし、本疾患の角膜実質の非薄化の原因を十分に説明しうる病因はいまだ見当たらない。円錐角膜の実質のどの部分がどのような状態で非薄化しているのか、という疑問を明確にすることは本疾患の病因を考える上で最も基本的なことと考えられる。そこで今回、我々は光学及び電子顕微鏡を用いて円錐角膜実質のコラーゲン線維の組織学的な検索を試み、さらに過去の文献を参考にしながら、円錐角膜における実質非薄化の直接的な原因について検討を加えたので報告する。

II 実験方法

対象として、順天堂医院及び防衛医科大学校病院において角膜移植時に得られた被移植片のうち18歳から35歳(平均25.5歳)の円錐角膜13症例を用いた。これら13症例はいずれも男性で、既往歴にデスメ膜破裂のないものを選んだ。発症から手術までの期間は4年から19年(平均11年)であった。対照角膜として、網膜芽細胞腫(1症例)、悪性黒色腫(2症例)で細隙灯顕微鏡で角膜所見に異常のない13歳、35歳、50歳の3症例を用いた。

1. 角膜実質厚および実質細胞数

得られた円錐角膜13被移植片、対照角膜3眼を1.0%グルタルアルデヒド、2.5%ホルマリン混合液(0.15モル磷酸緩衝液 pH 7.2)固定した後、通常の組織学的手法でエボン包埋し、角膜表面と垂直方向の光学顕微鏡用切片を作成しトルイジン青染色の後、光学顕微鏡写真撮影し印画紙上から角膜実質厚を計測した。さらに同様に撮影された光学顕微鏡写真の印画紙上で $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の単位面積内に存在する実質細胞数を計測した(図1)。計測は中央部と周辺部の2カ所で施行した。

2. コラーゲン薄葉の総数・厚さおよびコラーゲン線維の直径

対象のうち円錐角膜6症例、正常角膜3症例について、実験1と同様にエボン包埋ブロックから角膜表面

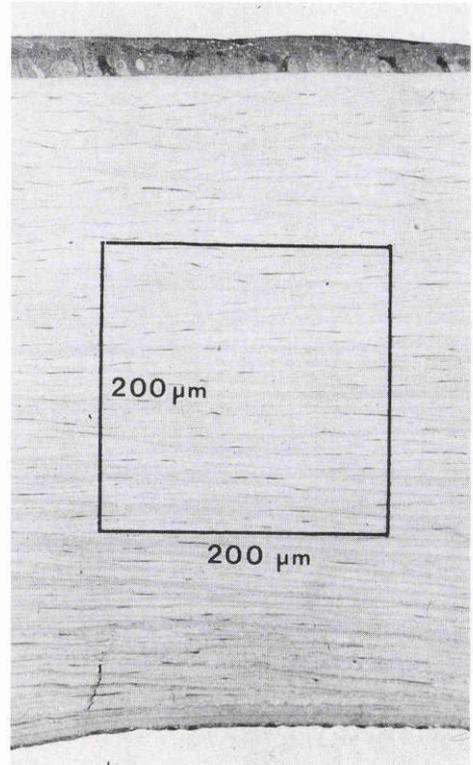


図1 光学顕微鏡写真の印画紙上で $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の単位面積内に存在する実質細胞数を計測($\times 190$)。

と垂直方向の超薄切片を作成し、0.1%クエン酸鉛水溶液及び10%リンタングステン酸水溶液にて角膜実質のコラーゲン線維を染色した後、実質全層にわたる電子顕微鏡写真を撮影し、印画紙上でコラーゲン薄葉の総数およびその厚さを計測した(図2)。また、コラーゲン線維の直径の計測にはコンピューター画像処理装置を用いて行った(図3)。計測部位は実験1と同様、中央部と周辺部の2カ所とした。また、コラーゲン薄葉の厚さ及びコラーゲン線維の直径については、ポーマン膜から $50\mu\text{m}$ の範囲の実質前層と、デスメ膜から $50\mu\text{m}$ の範囲の深層とに分けた計測も試みた。

III 結 果

1. 角膜実質厚および実質細胞数

光学顕微鏡写真上で角膜実質の厚さを計測すると、円錐角膜の中央部では平均 $308.5 \pm 68.8\mu\text{m}$ であったのに対し、対照角膜では $501.6 \pm 39.5\mu\text{m}$ と有意に円錐角膜で薄くなっていた($p < 0.01$)。周辺部においても円錐角膜 $445.8 \pm 84.6\mu\text{m}$ 、対照角膜 $556.9 \pm 32.8\mu\text{m}$ と

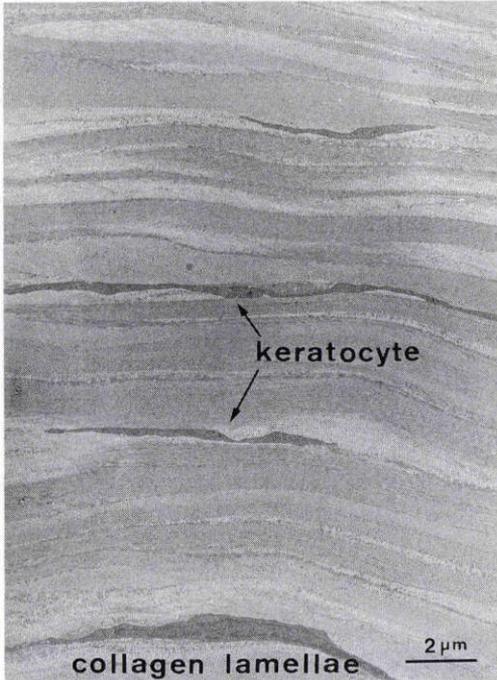


図2 電子顕微鏡写真の印画紙上でコラーゲン薄葉の総数及び厚さを計測 (×4,700).

中央部と同様に円錐角膜で有意に薄くなっていた ($p < 0.05$) (表1). 角膜実質細胞数について, 単位面積 ($200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$) 内の実質細胞数の計測を試みると, 円錐角膜中央部では平均25.9, 対照角膜で平均24.0と円錐角膜でわずかに多いものの, 両者の間に有意差は認められなかった (表2).

2. コラーゲン薄葉の総数・厚さおよびコラーゲン線維の直径

実質全層におけるコラーゲン薄葉の総数は, 円錐角膜中央部では 219.3 ± 12.7 , 周辺部では 242.0 ± 27.6 と中央部で少なく, 周辺部に多くなっていた. また, 対照角膜中央部の 304.0 ± 35.0 と比較すると, 円錐角膜中央部で有意に減少していた ($p < 0.01$) (表3). また, 個々の症例を検討すると図4に示すように, 円錐角膜, 対照角膜ともに角膜実質の厚さとコラーゲン薄葉の総数には正の相関が認められた (相関直線 $Y = 160.052 + 0.27618X$).

表1 角膜実質の厚さ (μm) (光学顕微鏡切片による).

| | 円錐角膜 (n = 13) | 対照角膜 (n = 3) | 有意差検定 |
|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| 中央部 | $308.5 \pm 68.8^*$ | $501.6 \pm 39.5^*$ | $p < 0.01^*$ |
| 周辺部 | $445.8 \pm 84.6^{**}$ | $556.9 \pm 32.8^{**}$ | $p < 0.05^{**}$ |

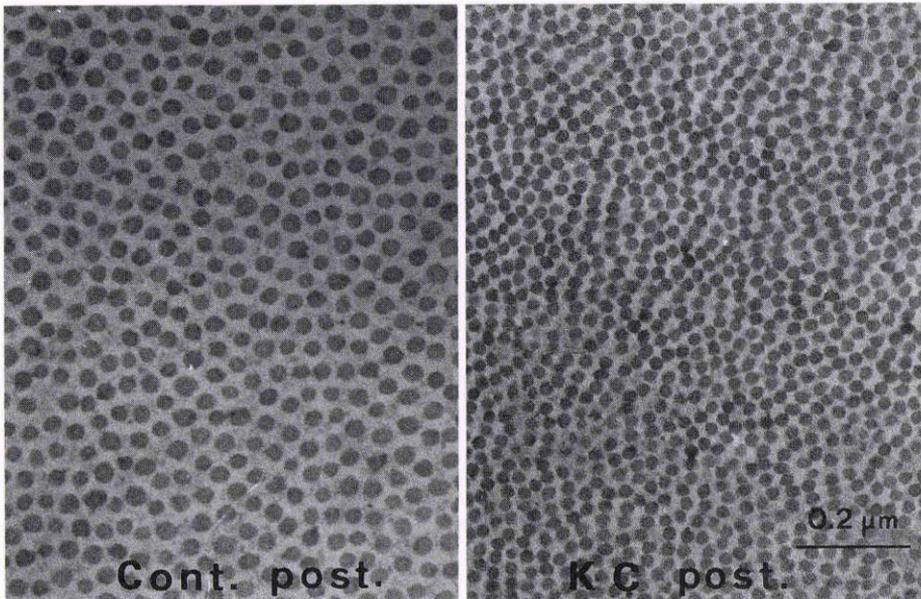


図3 左は対照の実質深層のコラーゲン線維, 右は円錐角膜の実質深層のコラーゲン線維 (×70,000).

表2 単位面積(200 μ m \times 200 μ m)当たりの角膜実質細胞数.

| | 円錐角膜 (n=13) | 対照角膜 (n=3) | 有意差検定 |
|-----|------------------|-------------------|---------|
| 中央部 | 25.9 \pm 7.3* | 24.0 \pm 9.0* | N. C.* |
| 周辺部 | 29.6 \pm 8.6** | 30.0 \pm 12.8** | N. C.** |

表3 コラーゲン薄葉総数.

| | | コラーゲン薄葉総数 | 実質の厚さ(μ m) |
|---------|-----|-------------------|------------------|
| 円錐角膜 | 中央部 | 219.3 \pm 12.7* | 308.2 \pm 18.1 |
| | 周辺部 | 242.0 \pm 27.6 | 426.3 \pm 61.9 |
| | 平均 | 229.0 \pm 25.2 | 359.1 \pm 72.3 |
| 対照角膜中央部 | | 304.0 \pm 35.0* | 501.6 \pm 39.5 |

(※: p < 0.01)

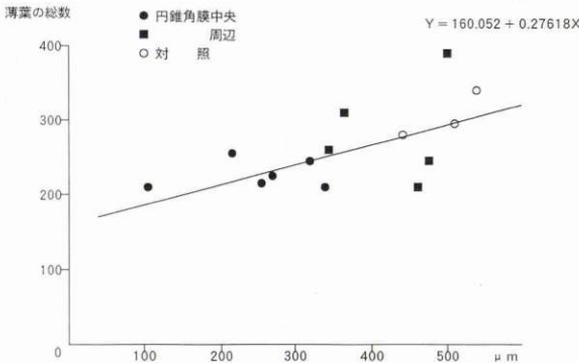


図4 実質の厚さに対する薄葉の総数

角膜実質全層におけるコラーゲン薄葉の厚さは、円錐角膜中央部で1.41 \pm 0.10 μ m、周辺部で1.81 \pm 0.42 μ mであった。一方、対照角膜中央部では1.66 \pm 0.11 μ mであり、円錐角膜中央部でやや薄い傾向がみられたが、有意差は認められなかった。次に実質をボーマン膜から50 μ mの範囲の前層とデスメ膜から50 μ mの範囲の深層に分けて、薄葉の厚さを計測した。前層では、円錐角膜の中央部で1.21 \pm 0.19 μ m、対照角膜中央部では1.29 \pm 0.23 μ mであり、両者間に有意差は認めなかった。一方、深層では円錐角膜中央部で1.27 \pm 0.10 μ mに対し、対照角膜中央部では2.92 \pm 1.54 μ mであり、その平均値では、対照に比べ円錐角膜では1/2以下であった。しかし、対照のSD値が大きく両者の間に有意差は認められなかった(表4)。

コラーゲン線維の直径は実質前層、実質深層に分けて計測した。円錐角膜では前層で24.73 \pm 2.20nm、深層24.99 \pm 2.61nm、対照角膜では前層30.02 \pm 1.50nm、深

表4 コラーゲン薄葉の厚さ.

| | | 実質全層の薄葉の厚さ (μ m) | 前層の薄葉の厚さ (μ m) | 深層の薄葉の厚さ (μ m) |
|---------|-----|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 円錐角膜 | 中央部 | 1.41 \pm 0.10* | 1.21 \pm 0.19** | 1.27 \pm 0.10*** |
| | 周辺部 | 1.81 \pm 0.42 | 1.13 \pm 0.11 | 2.00 \pm 0.79 |
| | 平均 | 1.58 \pm 0.35 | 1.18 \pm 0.18 | 1.59 \pm 0.65 |
| 対照角膜中央部 | | 1.66 \pm 0.11* | 1.29 \pm 0.23** | 2.92 \pm 1.54*** |

(*, **, ***: いずれもN. C.)

表5 コラーゲン線維の直径(nm).

| | 円錐角膜 (n=6) | 対照 (n=3) |
|------|--------------------|--------------------|
| 実質前層 | 24.73 \pm 2.20* | 30.02 \pm 1.50* |
| 実質深層 | 24.99 \pm 2.61** | 30.26 \pm 1.44** |

(*, **: P < 0.01)

層30.26 \pm 1.44nmであった。両者共に実質前層と深層との間には有意差は認められなかった。しかし円錐角膜と対照角膜を比較すると、実質前層、深層ともに円錐角膜のコラーゲン線維は有意に細くなっていた(p < 0.01)(表5)。

IV 考 按

本研究に先立って我々は、円錐角膜の実質細胞数について2つの可能性を考えていた。すなわち、第一の可能性として、角膜実質の厚さの薄い円錐角膜では、実質細胞が正常角膜に比べより高密度に分布しており、角膜全体の実質細胞の絶対数は、正常のそれと変わらない。また他の考え方としては、単位面積(体積)当りの細胞数は対照角膜と変わらず、角膜全体としては厚さの薄い円錐角膜の実質細胞数は対照角膜に比べ減少している、という可能性があった。そこで、切片上で単位面積(200 \times 200 μ m)当りの実質細胞数の計測を試みたところ、表2のごとく、円錐角膜と対照角膜との間に有意差は認められず、後者の考え方が妥当であろうと思われた。すなわち円錐角膜実質細胞の細胞密度は対照角膜とほぼ同様であり、角膜全体の細胞数としては、実質の薄い分だけ対照角膜に比べ減少していると結論できた。実質細胞の総数が正常角膜に比べ減少しているとすれば、このことが本症における角膜実質の菲薄化の直接的な原因と考えることも出来る。すなわち、仮に個々の実質細胞の産生するコラーゲン産生量が正常と仮定すると、総細胞数が減少しているために、角膜全体のコラーゲン産生量は減少し、その結果として、角膜の菲薄化を惹起させる、という仮説が成り立つ。Yueら⁵⁾は、円錐角膜と正常角膜の実質細

胞を培養し、両者の間に増殖能の違いはなかったとしながらも、継代培養を続けると正常角膜由来の実質細胞は20~30代も培養できるのに対し、円錐角膜由来のものでは10代~15代しか継代培養できなかつたとしている。このことは、円錐角膜の実質細胞は、正常の実質細胞に比べより早い時期に老化し、その増殖能を低下させ細胞数の減少を招いていることを示唆しているのかもしれない。

実質細胞の数量的な問題もさることながら、本症の実質細胞のコラーゲンやグリコサミノグリカンの産生に関する変化はどうであろうか。円錐角膜の実質細胞のコラーゲン産生について、Yue ら⁶⁾は培養細胞を用いて、産生されるコラーゲン量を正常角膜と比較し、両者のコラーゲン産生量に差はなかつたと述べている。また Newsome ら⁷⁾も円錐角膜の I, IV型コラーゲンの産生量、角膜内分布にはほぼ異常は認められなかつたと報告している。我々^{3,8)}の免疫組織化学的検索でも、I, III, V型コラーゲンの円錐角膜実質内の分布は正常角膜との間に明かな差異は認められなかつた。しかし、一方で、Rehany ら⁹⁾は、ラジオアイソトープを用いた組織学的観察で、³H-proline が培養円錐角膜片の実質細胞を含むすべての細胞層で正常角膜片にくらべて、より強く取り込まれたとし、本症における蛋白合成の亢進を示唆している。また Ihalainen ら²⁾もコラーゲン合成を反映する proly-4-hydroxylase 活性が円錐角膜実質細胞で亢進していることを示している。本症のグリコサミノグリカンの産生についても Bleckmann ら¹⁰⁾、Yue ら⁵⁾によって報告がなされているが、両者の結果は矛盾点が多く、明らかな結論には達していないようである。すなわち、本症のコラーゲンおよびグリコサミノグリカンの産生に関する変化は、いずれも未だ十分な説明がなされているとは言い難いものと思われる。

円錐角膜中央部と対照角膜中央部のコラーゲン薄葉の総数は、円錐角膜で有意に減少していた。また個々の症例について調べてみても、円錐角膜でも対照角膜でも、実質の厚さの厚いものは薄葉数が多くなっていた。これは過去の Hamada ら¹¹⁾、Pouliquen ら¹²⁾の報告と一致する結果であり、本症における角膜実質の厚さを規定する上でコラーゲン薄葉数は重要な要因であることが推測された。各々の薄葉の厚さについては、いずれの数値も対照との間に有意差は認められなかつた。しかし、実質深層のコラーゲン薄葉の厚さをみると、円錐角膜中央部での平均値は対照角膜に比べ1/2以

下であったにもかかわらず、有意差は認められなかつた。これは対照角膜の症例数が少なかつたこととともに、対照角膜の標準偏差値がかなり大きかつたためと思われた。このことは、正常角膜実質深層部のコラーゲン薄葉の厚さは、必ずしも均一ではなく、かなり厚いものも多く存在するのに対し、円錐角膜ではこれらの通常存在するはずの厚い薄葉がそっくり抜け落ちてしまったか、または薄い薄葉はさらに薄くあるいは消失し、厚い薄葉が薄くなつたことが本症の薄葉数の減少、菲薄化の直接的な原因とも考えられた。

円錐角膜のコラーゲン線維の直径について、今回の観察では、対照角膜に比べ有意に細くなつていた。コラーゲン線維の直径を左右する要因は、コラーゲン分子内のヒドロキシリジン量であり、更にそのグリコシレーション量と考えられている。すなわちヒドロキシリジンのグリコシレーション量の多いコラーゲン線維は、その直径が細く、しかも均一となると考えられている¹¹⁾。それでは、円錐角膜のヒドロキシリジン量はどうか。Cannon らの報告⁴⁾によると、本症の実質コラーゲン中のヒドロキシリジン量は正常に比べ有意に低下しているという。この結果が正しいとすれば、本症のコラーゲン線維の直径は、正常に比べ太くなると考えるべきで、我々の今回の結果とは矛盾することになる。Pouliquen ら¹²⁾も我々と同様に円錐角膜のコラーゲン線維の直径を測定し、正常と比べ、実質深層でやや太くなつていと報告している。現在のところ、我々は、これらの報告との矛盾点を明確に説明しうることは出来ない。更に症例数を増やして検討すべきと考えている。また、コラーゲン分子内のヒドロキシリジンはコラーゲン分子が細胞外に出た後、リジンの水酸化によって生成される。このリジンの水酸化には鉄イオン (Fe⁺⁺) が Co-factor として必要である。一方、本疾患に認められるフライシャー環は、金井¹³⁾によればフェリチン様物質と考えられている。角膜局所における何らかの鉄の代謝障害、その為のリジンの水酸化の異常、さらにコラーゲン線維の架橋・太さの異常へと病因を推測することも仮説としては考えられる。しかし、これまで本疾患の鉄代謝に関する報告は我々の知る限り全く見当たらず、コラーゲン線維の太さと関連して、今後検討すべき課題の一つと思われる。

今日まで円錐角膜に関して様々な報告がなされているにもかかわらず、本疾患の角膜実質菲薄化の直接的な原因、すなわち実質のどの部分がどのように菲薄化

しているのかを論じた報告はきわめてわずかであった。今回の観察から、円錐角膜実質について我々が知り得たことは、1) 実質細胞総数の減少、2) コラーゲン薄葉数の減少、3) コラーゲン線維の直径の細化、とまとめることができる。3)については前述したとおり、もう少し検討する必要があるものと思われるが、少なくとも1)および2)の結果から、円錐角膜の実質は実質細胞も含めたコラーゲン薄葉の一部がそっくり抜け落ちていたために菲薄化が起きているのではないかと推測された。なぜこのような形の角膜実質の菲薄化が円錐角膜で起きるのか。先に述べたように、本症のコラーゲン代謝過程のうち、その産生段階に異常があるとする報告の一方で、コラーゲナーゼによる分解の亢進によって惹起されているとする報告も Rehany⁹⁾、Koa¹⁴⁾、Ihalainen²⁾によってなされている。しかし、今回の観察結果からは、角膜潰瘍の際に認められるようなコラーゲナーゼ活性の上昇によるコラーゲン分解亢進のための菲薄化と考えるにはコラーゲン薄葉の抜け落ち方があまりに整然としすぎているように思われた。コラーゲン分解の亢進というよりもコラーゲンの産生過程における異常、さらにコラーゲン薄葉を単位とする角膜実質全体としての構築過程における異常ととらえたほうが良いように思われた。

文 献

- 1) **Bron AJ, Tripathi RC, Harding JJ, et al:** Stromal loss in keratoconus. *Trans Ophthalmol Soc UK* 98: 393—396, 1978.
- 2) **Ihakainen A, Salo T, Forsius H, et al:** Increase in type I and type IV collagenolytic activity in primary cultures of keratoconus corneas. *Eur J Clin Invest* 16: 78—84, 1986.
- 3) **Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, et al:** Distribution of type I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 18: 1—10, 1986.
- 4) **Cannon AJ, Foster CS:** Collagen crosslinking in keratoconus. *Invest Ophthalmol* 17: 63—65, 1978.
- 5) **Yue BYJT, Baum JL, Silbert JE:** The synthesis of glycosaminoglycans by cultures of corneal stromal cells from patients with keratoconus. *J Clin Invest* 63: 545—551, 1979.
- 6) **Yue BYJT, Baum JL, Smith BD:** Collagen synthesis by cultures of stromal cells from normal human and keratoconus corneas. *Biochem Biophys Res Commun* 86: 465—472, 1979.
- 7) **Newsome DA, Foidart JM, Hassell JR, et al:** Detection of specific collagen type in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 738—750, 1981.
- 8) **土屋 桜, 田中 稔, 中安清夫, 他:** 正常および円錐角膜における特異のコラーゲンとフィブロネクチンの分布について. *日眼会誌* 89: 270—278, 1985.
- 9) **Rehany U, Shashan S:** In vitro incorporation of proline into keratoconic human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1254—1257, 1984.
- 10) **Bleckmann H, Krease H:** Studies on the glycosaminoglycan metabolism of cultured fibroblasts from human keratoconus corneas. *Exp Eye Res* 30: 215—219, 1980.
- 11) **Hamada R, Giraud B, Puliquen Y:** Analytical and statistical study of the lamellae, keratocytes and collagen fibrillae of the central region of the normal human cornea. *Arch Ophthalmol (Paris)* 32: 563—570, 1972.
- 12) **Pouliquen Y, Graf B, Hamada R, et al:** Fibrocytes in the keratoconus, morphological appearance and modification of the extra-cellular space. *Arch Ophthalmol (Paris)* 35: 571—586, 1972.
- 13) **金井 淳:** 円錐角膜の電子顕微鏡的観察. *日眼会誌* 72: 902—918, 1968.
- 14) **Koa WWY, Vergnes JP, Ebert J, et al:** Increased collagenase and gelatinase activities in keratoconus. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 929—936, 1982.