

実験的角膜アルカリ外傷における sulfated proteoglycan の変化について

福地 健郎¹⁾, 沢口 昭一¹⁾, 原 浩昭¹⁾, 阿部 春樹¹⁾, 岩田 和雄¹⁾, 海谷 忠良²⁾

¹⁾新潟大学医学部眼科学教室, ²⁾聖隷浜松総合病院眼科

要 約

家兎眼に実験的角膜アルカリ外傷を作製し, キュプロリニックブルー (CB) 染色によって検出される角膜実質の硫酸化プロテオグリカン (S-PG) の形態と, その経時的变化について調べた. 実験には白色家兎を用い, 外傷後1時間, 3日, 1週, 2週, 1か月, 2か月の時点で眼球を摘出し, 混濁中央部を細切, CB染色し, 透過電顕で観察した. アルカリ外傷後, 1時間で既にコラーゲン線維, およびCB陽性のS-PGの配列は乱れていた. 3日後, 1週後にはいずれの部位でもCB陽性のS-PGは著しく減少していた. 2週後に実質前部でCB陽性の大きいフィラメントが認められ, これらは1か月後にはさらに大きく, かつ電子密度の高い異常な形態を示していた. 2か月後にはコラーゲン線維に規則正しく配列したフィラメントの回復がみられた. 角膜アルカリ外傷によって, 実質のCB陽性のS-PGは一旦減少し, 徐々に回復がみられる. そしてS-PGの経時的变化は角膜混濁の臨床経過と良く相関していた. (日眼会誌 96:1357-1365, 1992)

キーワード: アルカリ外傷, 角膜実質, 白色家兎, 硫酸化プロテオグリカン, キュプロリニックブルー

Changes of Sulfated Proteoglycans in Alkali Injured Rabbit Cornea

Takeo Fukuchi¹⁾, Shoichi Sawaguchi¹⁾, Hiroaki Hara¹⁾,
Haruki Abe¹⁾, Kazuo Iwata¹⁾ and Tadayoshi Kaiya²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

²⁾Eye Clinic, Hamamatsu Seirei-General Hospital

Abstract

Morphological changes of sulfated proteoglycans (S-PGs) in the stroma of alkali injured rabbit corneas were examined electron-histochemically following cuprolinic blue (CB) dye binding. The injured eyes were followed for 2 months by slitlamp microscope and photographs. At 1 hour, 3 days, 1 week, 2 weeks, 1 month, and 2 months after the injury, the eyes were enucleated and studied. After 1 hour, while both collagen fibrils and the filaments of S-PGs had already become disarranged; the number of S-PGs appeared to decrease. From 3 days to 1 week after, the number as well as the electron-density of S-PGs were markedly decreased in all areas. After 2 weeks, CB-positive large filaments appeared in anterior stroma. These became larger, more abnormal in shape, and displayed a higher electron density 1 month later. Normally arranged S-PGs can be seen at 2 months later. It was concluded that S-PGs were diminished in alkali-injured corneas. Once they were replaced by abnormal filaments, they gradually recovered normal morphology. Further more the time course of S-PG change correlated with that of corneal transparency after alkali injury. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:1357-1365, 1992)

Key words: Alkali injury, Corneal stroma, White rabbit, Sulfated proteoglycan, Cuprolinic blue

別刷請求先: 951 新潟市旭町通一番町 新潟大学医学部眼科学教室 福地 健郎

(平成4年2月26日受付, 平成4年6月2日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Fukuchi, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine, Ichibancho, Asahimachidori, Niigata 951, Japan

(Received February 26, 1992 and accepted in revised form June 2, 1992)

I 緒 言

プロテオグリカン (PG) はコア蛋白に少なくとも1つ以上のグリコサミノグリカン (GAG) の鎖が共有結合してできた一群の細胞外マトリックス分子の総称で、生体内に広く分布し、組織構造や形態の維持、細胞の接着、分化、移動などに重要な役割をはたしている^{1)~3)}。角膜のPGはコラーゲンとともに実質を構成する重要な成分であり、コラーゲン線維などの他の細胞外マトリックスと共同して、角膜の組織強度の維持、透明性の維持、電解質や水分の調節などに関与している^{4)~9)}。量的には実質の約1%を占め、その成分はケラタン硫酸が最も多く、次いでデルマタン硫酸とされている⁶⁾。

一方、角膜アルカリ外傷は、その危険性が広く知られているにも関わらず、いまだしばしば遭遇する疾患で、著しい視機能の低下を引き起こし、一般に予後不良である¹⁰⁾¹¹⁾。その問題点としては、多くが挙げられるが、特に角膜の脆弱化とそれによって生ずる穿孔、治癒後の角膜混濁の残存という問題に関して、その機能から考えPGもまた、重要な一要素となっている可能性が高い。これまでも角膜アルカリ外傷で、実質内の硫酸化されたGAGが著しく減少し、その経時的変化は混濁の経過と良く相関したとの報告がみられる^{12)~14)}。今回は、キュプロロニックブルー (CB) という銅色素を用いた電顕組織化学的方法^{15)~20)}によって、家兎眼に作製した角膜アルカリ外傷の際の、硫酸化PG (S-PG) の経時的変化について検討した。実質の形態学的変化に関する報告は数多く見られ、既に電顕レベルまで詳細に検討されている¹³⁾¹⁴⁾²¹⁾²²⁾。今回の研究では、CBを用いることによって、S-PGの質的、量的変化や、周囲の微細構造との関係という、これまでとは違った情報を電顕レベルで得ることが可能となり、興味ある結果が得られたので報告する。

II 実験方法

実験には体重2.5~3.0 kg 日本白色家兎を用いた。実験的アルカリ外傷の作製方法は、Chungら²³⁾²⁴⁾の方法に準じた。つまり実験動物に苦痛を与えぬよう留意し、塩酸ケタミン (ケタラール®) 1.0 ml の筋注による全身麻酔、塩酸オキシプロコカイン (ペノキシール®) による点眼麻酔をした後に、1 N 水酸化ナトリウムに浸した直径5.5 mm の円形の濾紙を、角膜中央部に1分間おき、それに続いて3分間生理的食塩水で洗浄し

た。各家兎は外傷後、1時間、3日、1週、2週、1か月、2か月の時点で、過剰量のケタラール®筋注、ペントバルビタールナトリウム (ネプタール®) 静注によって屠殺し、速やかに眼球を摘出し、2%パラフォルム (pH 7.4) 溶液で固定した。

CB染色を用いた電顕組織化学の標本は、以下の手順で作製し^{16)~18)}、日立H-7000型透過型電子顕微鏡で観察した。

- 1) 角膜のみを切り出し、さらに細切した。標本としては混濁の中央部直径約2.0 mmの範囲のみを用いた。2.5%グルタル・2%パラフォルム (pH 7.4) で24時間、固定。
- 2) 25 mM 酢酸ナトリウム・0.1 M 塩化マグネシウム・2.5%グルタル pH 5.7 で15分間、3回平衡化。
- 3) 平衡化に用いた固定液で0.05%CB溶液を作製し、20°Cで24時間、CB染色。
- 4) 平衡化に用いた液で5分間、3回洗浄。
- 5) 0.5%タングステン酸ナトリウム/蒸留水で5分間、3回洗浄。
- 6) 0.5%タングステン酸ナトリウム/エタノールで5分間、3回洗浄。
- 7) アルコール系列で脱水。
- 8) エポキシ樹脂/酸化プロピレンで浸透。
- 9) 重合
- 10) 超薄切片作製、電子染色 (酢酸ウラニルのみ)

III 結 果

家兎眼の実験的アルカリ外傷後に観察された臨床経過は、以下の通りである (図1)。外傷部は直後から円形、かつ均一な、境界明瞭な混濁として認められ、上皮は剝離し潰瘍を形成していた。1時間後には前房の炎症が観察され、結膜充血が認められた。3日後に炎症性変化は最も強く、外傷部だけでなく周辺部角膜も、浮腫によって強く混濁し、アルカリ外傷で混濁した部分との境界が不明瞭となっていた。結膜充血も著明であった。1週後には、炎症は軽快し、浮腫も軽減、外傷中央部の混濁も一旦、軽減した。その後、2週、1か月と次第に、混濁部の範囲は徐々に縮小したが、中央部の混濁の程度は増強し、厚みも増していた。2か月後では、混濁部の範囲はさらに縮小し、また混濁の程度や厚みも次第に減少していた。

これらの時点で採取した角膜中央部の標本を、CBを用いた電顕組織化学によって観察したところ、著明な変化が認められた (図2~7)。まず正常角膜実質で

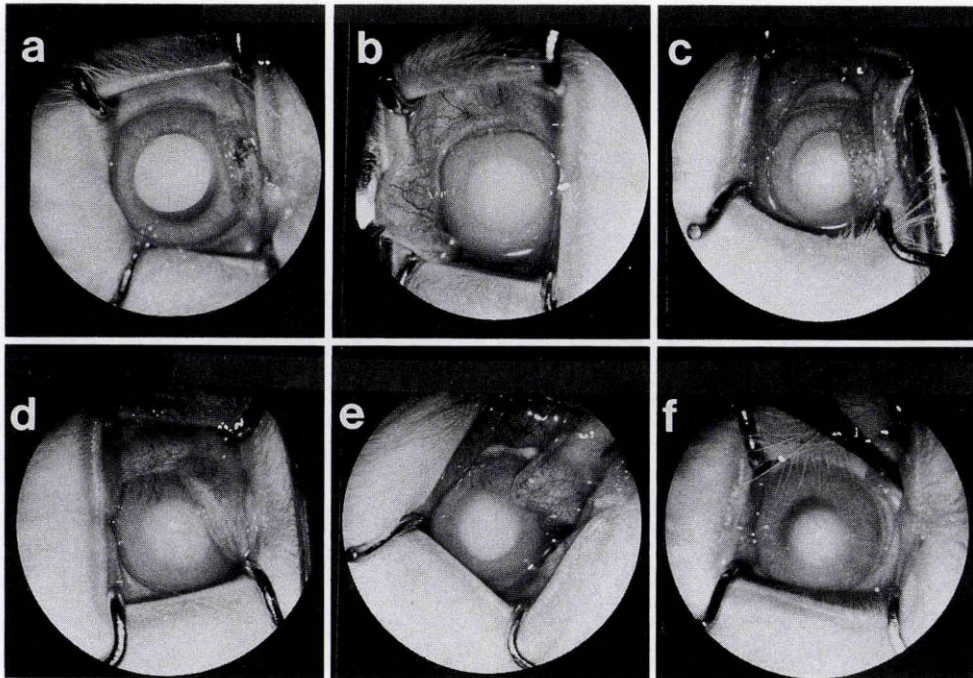


図1 アルカリ外傷後の臨床経過。

a: 1時間後に外傷部は直後から円形、かつ均一な、境界明瞭な混濁として認められた。b: 3日後に炎症性変化が最も強く、外傷部だけでなく周辺部角膜も浮腫によって強く混濁していた。c: 1週後には、浮腫は軽減、外傷中央部の混濁も一旦、軽減した。d: 2週後、e: 1か月後と次第に、混濁部の範囲は徐々に縮小したが、中央部の混濁の程度は増強し、厚みも増していた。f: 2か月後では、混濁部の範囲はさらに減少し、また混濁の程度や厚みも徐々に減少していた。

は、CBによって検出されるS-PGは、比較的小さいフィラメント状の物質として認められ、規則正しく配列したコラーゲン線維とともに多数認められた。これをさらに詳細に観察すると、コラーゲン線維に規則正しい間隔で配列する成分(周期は46~54 nm)と、その走行に沿うように不規則に分布する成分とが認められた。上皮に近い前部実質と、内皮に近い後部実質を比較した場合、後部でよりフィラメントが長めで、密な傾向であった(図2)。

それに対して、アルカリ外傷後、1時間の実質では、いずれの部位でもコラーゲン線維の配列は乱れ、間隙が開いていた。S-PGのフィラメントは一部コラーゲン線維に付着していたが、多くは離れ散在していた。フィラメントの大きさや電子密度の点では正常眼とも差は認められなかった(図3)。3日後では、CBにより染色されたフィラメントは、著しく減少し、特にコラーゲン線維に付着した成分はほとんど認められな

かった。一部、コラーゲン線維束の間隙に集積したフィラメントが認められたが、電子密度は著しく低かった。1週後に実質ではコラーゲン線維の変性と無構造物質の沈着が認められた。S-PGは著しく減少し、著しく電子密度の低いフィラメントがごくわずかに認められるのみであった(図4)。2週後には、主に前部実質の一部で、明瞭なフィラメントが出現し、これらは正常に比較し大きく電子密度も高かった。これらの変化は線維芽細胞化した実質細胞の近傍で強く認められた(図5)。1か月後では多くの部位で大小不同の著しい、一般に電子密度が高く、異常な形態を持つフィラメントが認められた。これらはコラーゲン線維の近傍に認められたが、その配列は不規則であった(図6)。2か月では一般にフィラメントの形態は安定し、大きさも正常より大きい、縮小傾向であった。電子密度も1か月に比べ低下し、正常眼に近かった。これらの中にはわずかではあるが、規則正しく配列するフィラメント

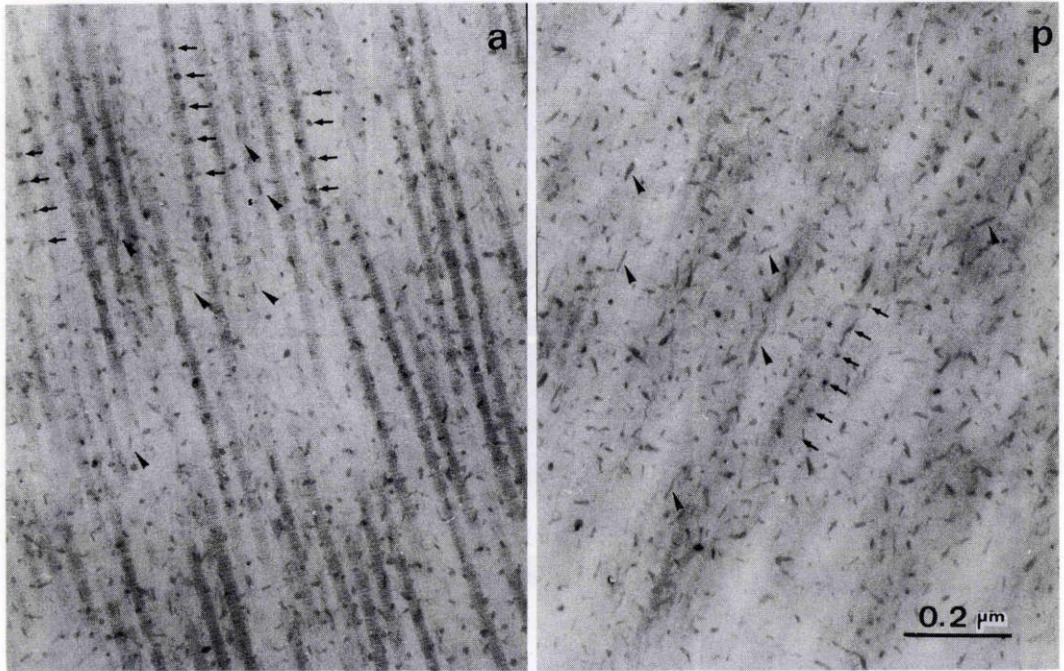


図2 家兎眼の正常角膜実質。

キュプロリニックブルーによって検出される硫酸化プロテオグリカンには、規則正しい間隔で配列する小さい成分(周期は約46~54 nm, 矢印)と、不規則に分布するより長い成分とが認められた(矢じり)。前部実質に比べ、後部でよりフィラメントが長めで、密な傾向であった。(×67,500, a: 前部実質, p: 後部実質, 以下図3~7も同様)。

が認められ、またコラーゲン線維の走行に沿うように付着するフィラメント、コラーゲン線維同志を橋渡しするようなフィラメントなども認められた(図7)。

いずれの時点においても、実験動物間で、S-PGの量的な密度にわずかに差を認めたが、今回の主目的であるS-PGの形態、および分布という点では個体差は認められなかった。

IV 考 按

角膜のGAGにはおそらくコラーゲン線維に付着する成分と、可溶性蛋白に付着する成分があり、一般に前者はコラーゲン線維のつなぎ合わせや、配列の維持に、後者は電解質や水分の保持に働いている^{1)~9)}。特に角膜の透明性の維持に関して、いくつか重要な要素が挙げられているが、例えば小さい、均一な径のコラーゲン線維が、均等に規則正しく配列していること⁹⁾、電解質や水分の比率が一定に保たれていること⁵⁾などが考えられており、いずれの点でもGAGは重要と考え

られている。またコラーゲン線維の適正な配列は組織の機械的強度にとって重要であり³⁾、また病的状態でのGAGの集積は角膜混濁の原因となる。

今回用いたCB^{7)8)15)~20)}は、陽性荷電した一種の銅色素で、これを臨界電解質濃度で用いると、生体内で強く陰性荷電したPGの硫酸基に、ほぼ特異的に結合し、従ってS-PGを表出することができる¹⁵⁾¹⁶⁾。この色素で染色した標本を透過電顕によって観察すると、S-PGはelectron denseな構造物として表現され、その形態の違いは構造上の違いを、また電子密度は生化学的硫酸化の程度をある程度、反映していると考えられている。これまでも角膜のS-PGをCB染色によって観察した報告は多くみられるが、正常角膜でCB陽性のS-PGは、密に配列したコラーゲン線維とともに多数認められ、一般にコラーゲン線維に沿って規則正しく配列する成分と、コラーゲン線維の隙間に差し込まれたような成分とが見られる⁷⁾⁸⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。そしてその形態から考え、前者はコラーゲン線維をつなぎ合わせ、後者

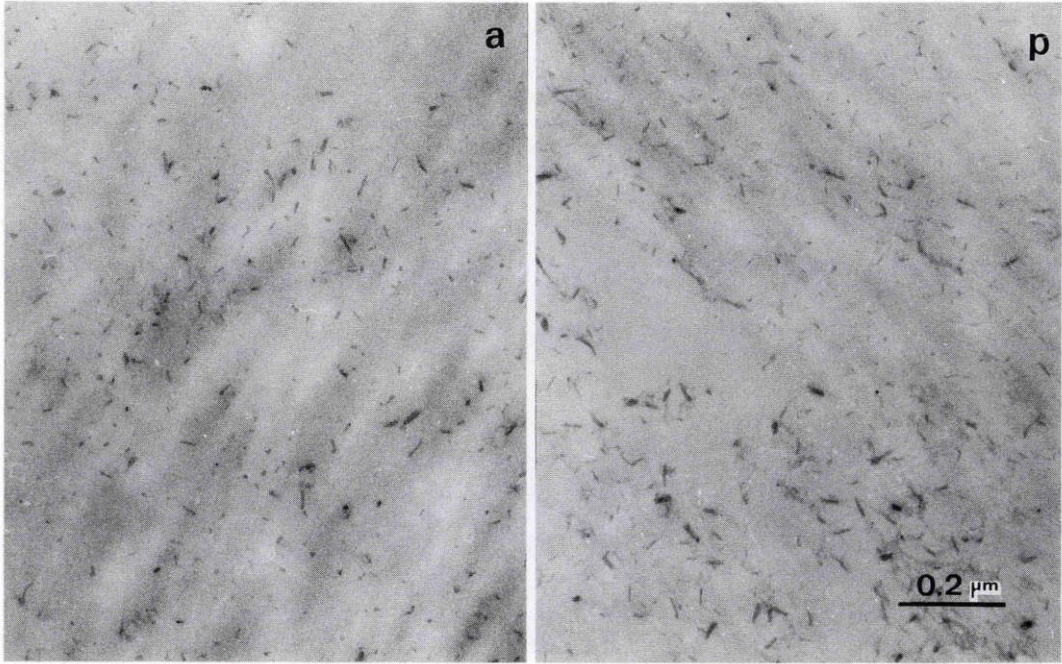


図3 アルカリ外傷後1時間。
いずれの部位でも硫酸化プロテオグリカンの多くは、コラーゲン線維を離れ散在して
いた。フィラメントの大きさや電子密度の点では変化を認めなかった。

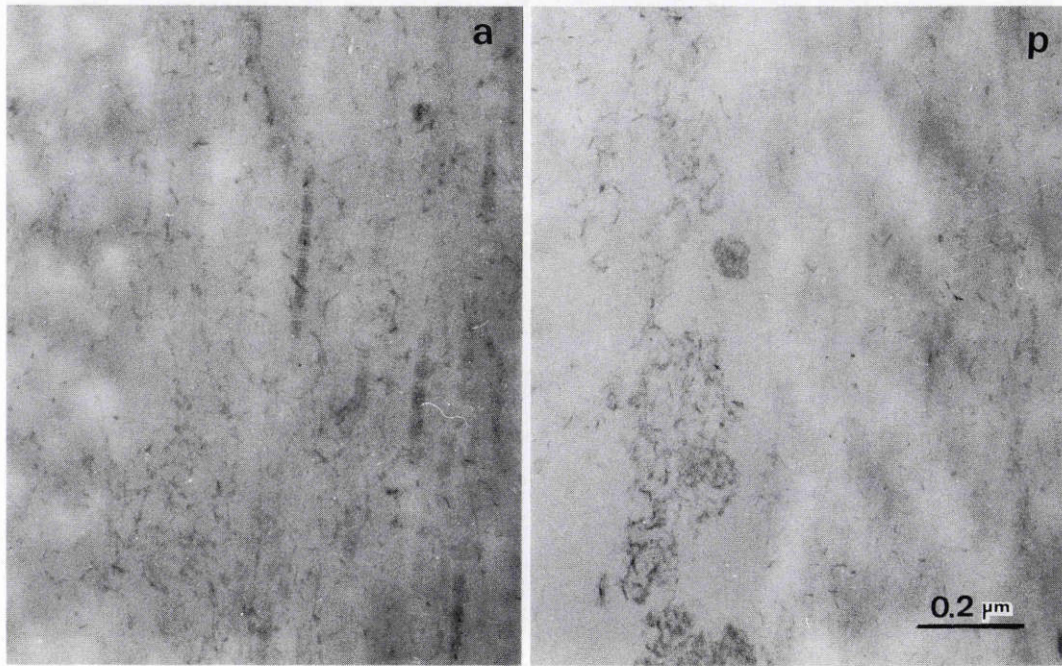


図4 アルカリ外傷後1週。
キュプロリニックブルーによって検出される硫酸化プロテオグリカンは著しく減少
し、電子密度の低いフィラメントがごくわずかに認められるのみであった。

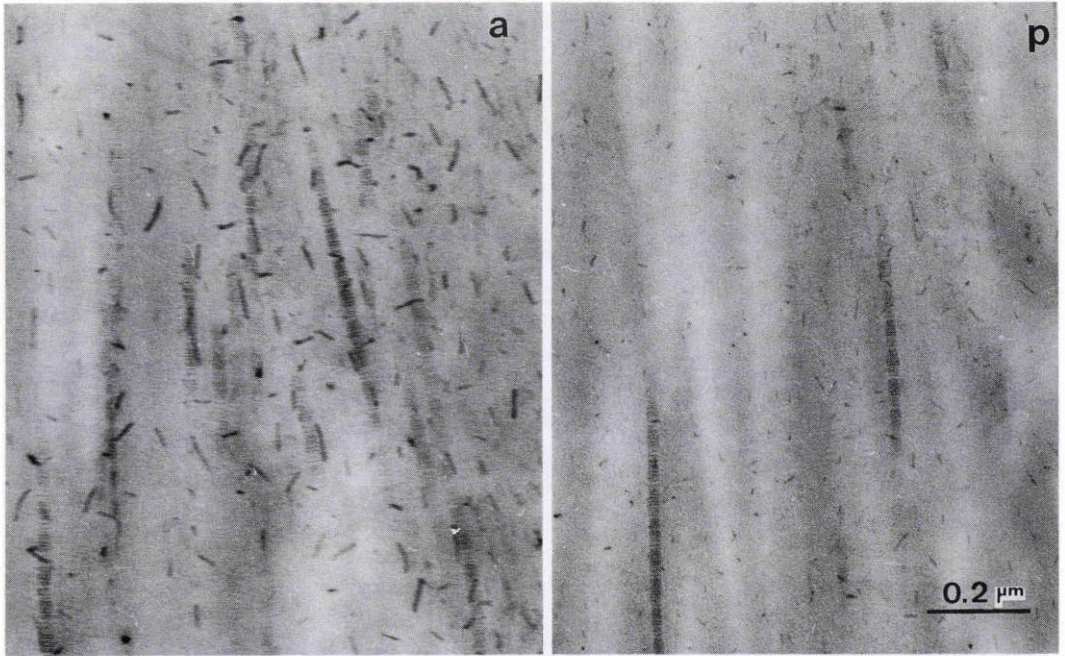


図5 アルカリ外傷後2週.

前部実質の一部で、明瞭なフィラメントが出現し、これらは正常に比較し大きく電子密度も高かった。

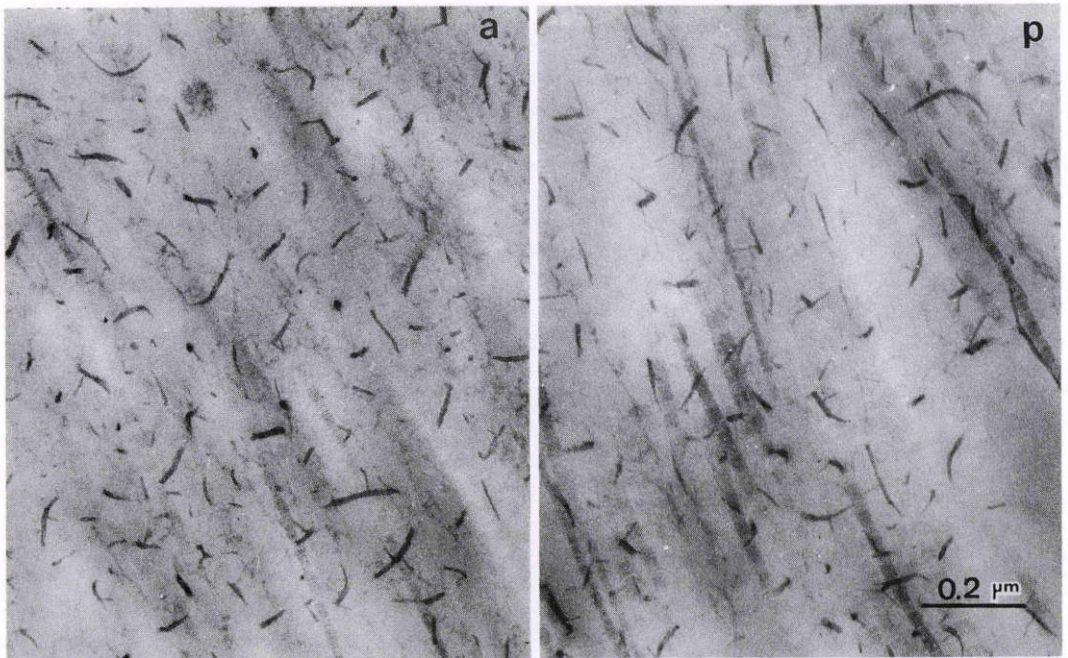


図6 アルカリ外傷後1か月.

多くの部位で大小不同が著しく、電子密度の高い、異常な形態を持ったフィラメントが、さらに多数認められた。これらはコラーゲン線維の近傍に認められたが、その配列は不規則であった。

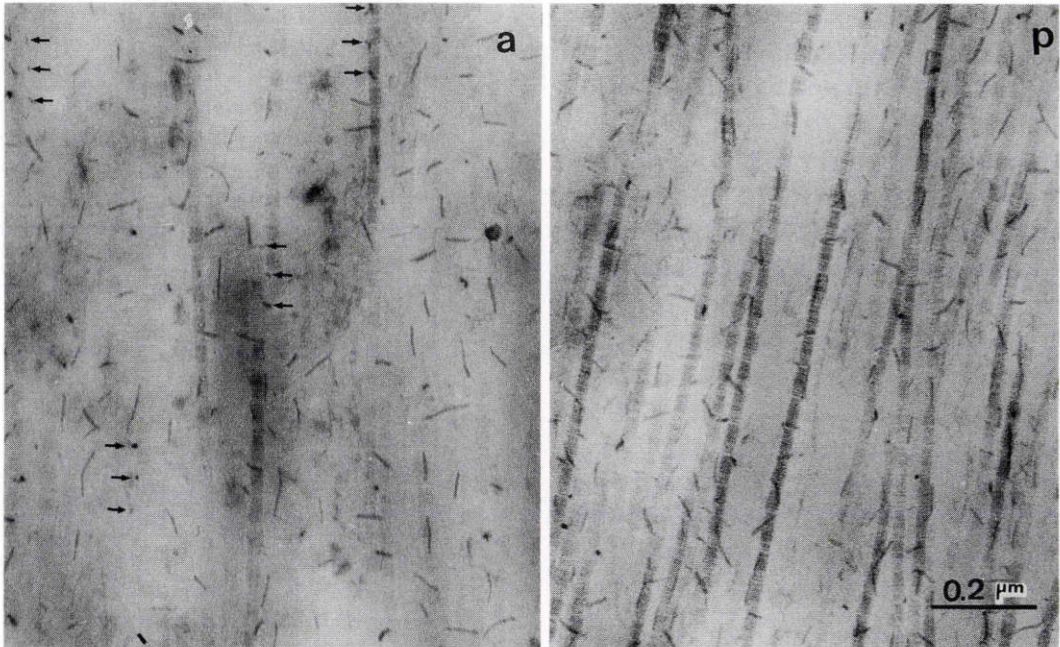


図7 アルカリ外傷後2か月。

一般にフィラメントの形態は安定し、大きさも1か月に比べ小さくなり、電子密度も低下していた。これらの中にはわずかではあるが、規則正しく配列するフィラメントが認められた。

はコラーゲン線維同志の距離を一定に保ち、併せて実質のコラーゲン線維の配列の調節と維持に働いていることを強く示唆している。生化学的に、前者は主にケラタン硫酸、後者は主にコンドロイチン硫酸およびデルマタン硫酸と考えられている¹⁸⁾。

CB陽性のS-PGは、今回の実験で作製されたアルカリ外傷によって、著しい変化を示していた。これらの結果からアルカリ外傷によって、実質のCB陽性S-PGは1週以内に著しく減少し、それらは1か月後をピークに一旦、異常かつ過剰なフィラメントとして置き換えられる。そして正常なCB陽性S-PGはゆっくりと回復してくることが明かとなった。一方、臨床所見では、初期には外傷部角膜の混濁は均一、かつ肥厚もわずかで、これは1週後に、一旦、軽快した。しかしその後、1か月をピークに角膜中央部の著明な肥厚と、混濁の増強が認められた。つまり角膜混濁は、外傷後1週前後で、質的に変化し、ちょうどこの時期に一致して、CB陽性のS-PGが最も減少していること、またその後のCB陽性のS-PGの質的变化と、角膜

の混濁の程度が良く相関していた。

これまでもアルカリ外傷後に見られる、GAGの変化を研究した報告はいくつか見られるが、これらは主に光顕レベルでの組織化学的方法によるものである^{12)~14)}。それらをまとめると、外傷後1週までの間に実質のGAG、特に硫酸化されたGAGが著しく減少し、3~4週になって主にコンドロイチン硫酸が、1~2か月ころからケラタン硫酸が出現し、次第に増加、4~6か月ではほぼ正常の状態を回復するとされている。今回の結果は、GAGの経過に関してこれまでの報告に良く一致しており、電顕レベルでこれまでの結果を支持するものと考えられる。一方、今回の研究で新たに確認された所見としては、2週以降に見られるコンドロイチン硫酸と考えられるS-PGの回復は、一旦、正常とは異なった成分によって行われること、2か月後ころには量的回復だけでなく、形態学的に配列もまた回復し始めていることなどが明かとなった。

ところでアルカリ外傷後の角膜混濁の経時的変化は、角膜の含水量の変化と良く相関していたとの報告

がある²⁴⁾。角膜実質のPGには、水分の吸着や、保持に働くというもう一つの重要な機能を有し²⁵⁾、従って角膜混濁と含水量の関係は、今回の結果と密接に関連していると考えられる。

CBはS-PGの側鎖に付着するS-PGの一種のマーカであり、従って今回の研究に加えて、量的変化、S-PGの質的变化という問題に関しては、違った方法でさらに検討の余地があり、まずこれら成分の生化学的特性に関して、特異酵素消化法を用いて現在検討中である。また家兎眼は人眼のアルカリ外傷と多くの点で異なり、特に混濁の回復に関して、家兎眼では完全に透明化するのに対して、人眼では一般に永久的な混濁を残して治癒する。これらの結果が人眼のアルカリ外傷の治療に関して、いかなる意義を持つかはさらに検討の余地があるが、PGもまた治療効果などを検討する上で、一つの指標となることが示唆された。また例えば外傷早期におけるPGの分解阻止が穿孔予防のための治療に、また慢性期における分解促進が混濁軽減のための治療になり得る可能性を示唆していると考えられた。

稿を終えるにあたり、聖隷浜松病院病理部、山田哲司技師、並びに新潟大学眼科学教室、荒木幸雄技官のご協力に感謝いたします。

なお、本稿の要旨は第57回日本中部眼科学会(浜松市)において発表した。

文 献

- 1) **Hascall VC, Hascall GK**: Proteoglycans, in Hay ED (ed): Cell Biology of Extracellular Matrix, New York, London, Plenum Press, 39—63, 1981.
- 2) **Hay ED**: Extracellular matrix. J Cell Biol 91: 205—223, 1981.
- 3) **Rouslahti E**: Structure and biology of proteoglycans. Ann Rev Cell Biol 4: 229—255, 1988.
- 4) **Hart GW**: Corneal proteoglycans, in McDevitt DS (ed): Cell Biology of the Eye, New York, Academic Press, 1—52, 1982.
- 5) **Waltman SR, Hart WM Jr**: The Cornea, in Moses RA, Hart WM (eds): Physiology of the Eye, Clinical Application, St. Louis, The C.V. Mosby Co., 36—59, 1987.
- 6) **Gregory JD, Damle SP, Covington HI, et al**: Developmental changes in proteoglycans of rabbit corneal stroma. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1413—1417, 1988.
- 7) **Scott JE**: The chemical morphology of keratan sulfate proteoglycans, in Greiling H, Scott JE (eds): Keratan Sulfate, London, The Biochemical Society, 122—134, 1989.
- 8) **Cintron C, Covington HI**: Developmental aspects of keratan sulfate, in Greiling H, Scott JE (eds): Keratan Sulfate, London, The Biochemical Society, 158—167, 1989.
- 9) **Hascall JR, Cintron C, Kublin C, et al**: Proteoglycans changes during retraction of transparency in corneal scars. Arch Biochem Biophys 222: 362—368, 1983.
- 10) **Parrish CM, Chandler JW**: Corneal Trauma, in Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, et al (eds): The Cornea, New York, Churchill Livingstone, 599—646, 1988.
- 11) **Kenyon K**: Decision-marking in the therapy of external eye disease. Noninfected corneal ulcers. Ophthalmology 89: 44—51, 1982.
- 12) **Cejkova J, Lojda Z**: Alkali burns of the rabbit cornea. II. A histochemical study of glycosaminoglycans. Histochemistry 45: 71—75, 1975.
- 13) **北野周作**: 角膜の創傷治癒. 三島濟一編: 眼科 Mook 15 角膜, 最近の知見. 東京, 金原出版, 40—50, 1981.
- 14) **望月一男, 村上道男, 北野周作**: 角膜腐蝕の実験的研究. 第1報. NaOH, HClによる腐蝕の組織学的変化について. 日眼会誌 71: 1112—1122, 1967.
- 15) **Scott JE**: Collagen-proteoglycan interactions. Biochem J 197: 887—891, 1980.
- 16) **Scott JE, Maigh M**: Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. Bioscience reports 5: 71—81, 1985.
- 17) **Cintron C, Covington HI**: Morphologic analysis of proteoglycans in rabbit corneal scar. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1789—1799, 1990.
- 18) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Chung I, et al**: Proteoglycan molecules in keratoconus corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 1846—1853, 1991.
- 19) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Fukuchi T, et al**: Sulfated proteoglycans in the human lamina cribrosa. Invest Ophthalmol Vis Sci (in press)
- 20) **福地健郎, 沢口昭一, 原 浩昭, 他**: サル眼の視神経篩状板における Sulfated proteoglycan について. 眼紀 42: 1780—1784, 1991.
- 21) **Matsuda H, Smelser GK**: Epithelium and stroma in alkali-burned corneas. Arch Ophthalmol 89: 396—401, 1973.
- 22) **Pfister RR, Burstein N**: The alkali burned cornea. I. Epithelial and stromal repair. Exp

- Eye Res 23 : 519—535, 1976.
- 23) **Chung JH, Fagerholm P**: Stromal reaction and repair after corneal alkali wound in the rabbit: A quantitative microradiographic study. *Exp Eye Res* 45 : 227—237, 1987.
- 24) **Chung JH, Fagerholm P**: The influence of human EGF on alkali wound healing—A long term rabbit alkali wound healing model and application, in Iwata S (ed): *Proceedings of the International Society for Eye Research, Vol 4*. New York, the International Society for Eye Research, 172, 1986.
- 25) **Castro JA, Brttelheim AA, Bettelheim FA**: Water gradients across bovine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 963—968, 1988.
-