

Nanophthalmos の1例の強膜に見られたプロテオグリカンの異常について

福地 健郎¹⁾, 沢口 昭一¹⁾, 本田 徳弼¹⁾, 斎藤 達也¹⁾

飯塚 裕子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

Uveal effusion を合併した nanophthalmos の1例に強膜開窓術を行い、その際に得られた強膜をキュプロリニックブルー (CB) 染色を用いた電子顕微鏡組織化学によって調べた。膠原線維は均等なやや小さめの線維が密に配列する部分と、大きめの不規則な線維が疎に配列する部分とが認められた。不規則な配列をする部では、膠原線維の大小不同が著しく、線維そのものにもねじれや枝分れなどの異常所見が認められた。また線維の周囲には線維性物質が取りまいていた。一方、CB 染色によって検出されるプロテオグリカンは全体に、正常眼に比較し密度が低く、小さく、電子密度の低いフィラメントが多かった。線維性物質内にも CB 陽性フィラメントはわずかであった。この症例では、膠原線維だけでなく、プロテオグリカンの形態やその組織化学的性状にも異常が認められ、この両者によって行われるべき機能に異常をきたしている可能性があり、uveal effusion の発症と何らかの関係があることが疑われた。(日眼会誌 97: 260—267, 1993)

キーワード: nanophthalmos, 強膜, 膠原線維, キュプロリニックブルー, プロテオグリカン

Proteoglycan Abnormality in a Nanophthalmos Sclera

Takeo Fukuchi¹⁾, Shoichi Sawaguchi¹⁾, Tokuhitsu Honda¹⁾

Tatsuya Saito¹⁾, Yuko Iizuka¹⁾, Kazuo Iwata¹⁾

and Tadayoshi Kaiya²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

²⁾Eye Clinic, Hamamatsu Seirei-General Hospital

Abstract

We examined a scleral specimen obtained from a nanophthalmos eye with uveal effusion at the surgery, using cuprolinic blue (CB) dye binding and electron microscopy. The nanophthalmic sclera was separated into two areas electron microscopically. One was an area composed of tightly packed collagen fibers, the other with irregularly arranged collagen fibers. In irregular areas, several abnormal findings, such as twisting or fraying, were detected in collagen fibers, which were surrounded by fine fibrous materials. Furthermore, CB-positive materials were fewer in number and less in size and electron density around the collagen fibers and in fine fibrous materials than in the normal eye. Since the nanophthalmic sclera in this study showed some abnormalities both in collagen fibers and in proteoglycans, we suggest that the function and/or interaction of both of these were abnormal.

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5月27日受付, 平成4年7月24日改訂受理)

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

(Received May 27, 1992 and accepted in revised form July 24, 1992)

mal, which might be related to the onset of uveal effusion. (J Jpn Ophthalmol Soc 97 : 260-267, 1993)

Key words: Nanophthalmos, Sclera, Collagen fiber, Cuproline blue, Proteoglycan

I 緒 言

Nanophthalmos は、先天性の眼異常で、小眼球、高度の遠視、浅前房、強膜の肥厚、uveal effusion の合併などの特徴を持っている^{1)~7)}。特に、uveal effusion に関して、強膜の肥厚による脈絡膜循環の異常が、その原因として考えられており²⁾⁸⁾、またプロテオグリカンの関与も疑われている^{4)~9)}。近年、uveal effusion に対する強膜開窓術の効果が、相次いで報告され²⁾³⁾、それと共に、手術時に切除された強膜を組織学的に観察した研究も報告されてきている^{4)~8)}。その所見として、電子顕微鏡（以下電顕）レベルで膠原線維の径のばらつき、ねじれたり、ほつれたような膠原線維の出現、線維性顆粒の沈着などが認められたと報告されている。今回、私どもは uveal effusion を伴った nanophthalmos の 1 例に、強膜開窓術を行い、良好な経過を見た。またその際、得られた強膜組織を、銅色素であるキュープロニックブルー（以下 CB）^{10)~14)} による染色を併用して、透過電顕的に観察し、膠原線維の変化に加えて、硫酸化プロテオグリカンの異常について観察した。これらの所見をこれまでの報告と比較、検討し、若干の知見を得たので報告する。

II 症例および実験方法

1. 症例；42 歳、女性

初診；1989 年 12 月 28 日

主訴；左眼視野欠損

既往歴；幼少時より、遠視で視力不良であった。

現病歴；1989 年 12 月 20 日ころより、左眼に飛蚊症あり、また左眼上方視野の欠損に気付いた。12 月 27 日、某院眼科を受診し、両眼の nanophthalmos と、それに続発する左眼の網膜剥離と診断された。新潟大学医学部附属病院眼科を紹介され、1990 年 1 月 4 日、精査、加療を目的に入院となった。また、近医受診時に、浅前房があったためレーザー虹彩切開術が行われた。

入院時所見；視力：右眼=0.06 (0.1×14.0 D-cyl 1.0 Da 170°)、左眼=0.02 (0.09×16.0 D-cyl 1.25 Da 15°)、眼圧：右眼=26 mmHg、左眼=20 mmHg (Goldmann 眼圧計)。

前眼部所見；両眼に小角膜（角膜径、両眼とも 10×

9 mm）、浅前房を認め、また左眼の上強膜静脈の怒張を認めた。

角膜曲率半径：右眼 6.49×6.25 mm、左眼 6.58×6.32 mm

中間透光体：両眼とも軽度の硝子体混濁を認めた。

眼底所見：右眼は異常所見を認めなかった。左眼には周辺部の脈絡膜剥離と共に、鼻側下方に胞状の網膜剥離を認めた。視神経乳頭は網膜剥離の為、確認できなかった。

眼軸長：右眼 19.2 mm、左眼 20.0 mm

ERG 所見：低電位であったが、左右差は認めなかった。

CT 所見：両眼の強膜の肥厚以外に、特記すべき所見はなかった。

経過：nanophthalmos に合併した uveal effusion と診断し、1 月 8 日左眼の強膜開窓術を行った。手術は 4 直筋の間の 4 象限に各々 6×4 mm の半層強膜弁を作成し除去した。過静脈は含まなかった。その中央部のみ径 1~2 mm の範囲のみ全層強膜片を除去し、脈絡膜を露出させた。術中、脈絡膜上液の排出を確認した。術後、網膜下液はゆっくりと減少し、次第に軽快した。視神経乳頭の充血と脈絡膜襞を確認した。

2. 実験方法

強膜開窓術で得られた 4 個の標本を各々半切し、半分はホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）標本とした。残りの半分をさらに半切し、3%グルタル固定し、CB 染色標本とし、以下の手順で処理した^{10)~14)}。

1) グルタル固定した各強膜片を更に 2~4 個に細切し、2.5%グルタル・2%パラフォルムアルデヒド (0.1 M ソレンセン磷酸緩衝液、pH 7.4) で一昼夜再固定。

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 溶液を作成し、室温で一昼夜、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（蒸留水中）で 5 分間、3 回洗浄。

6) 0.5%タングステン酸ナトリウム（50%エタノー

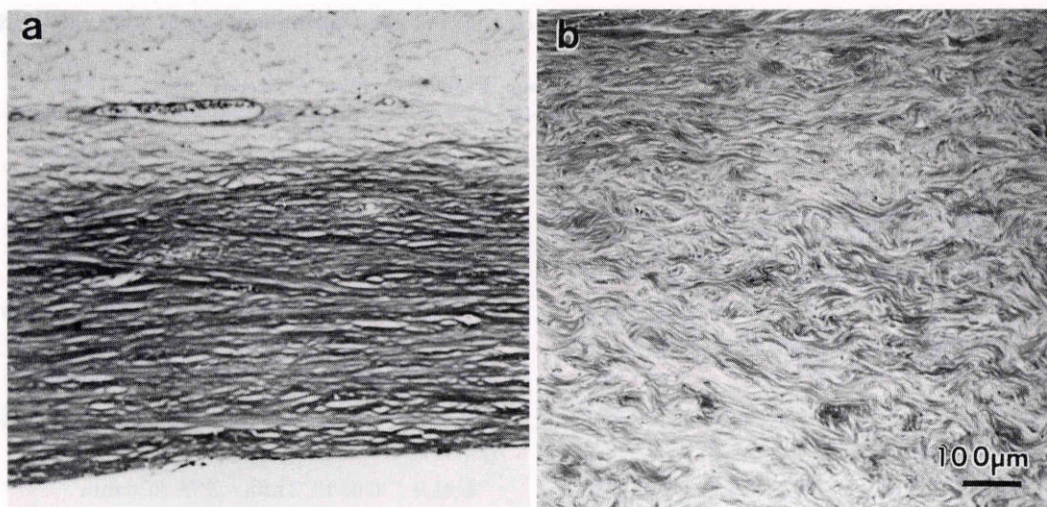


図1 正常眼ならびに nanophthalmos 眼における強膜の光学顕微鏡所見 (HE 染色).
a: 正常眼強膜, b: nanophthalmos 眼強膜. 正常眼では整然とした膠原線維による層状構造を示しているのに対して, nanophthalmos 眼では著しく屈曲し, 層状構造も明かでない. ($\times 75$)

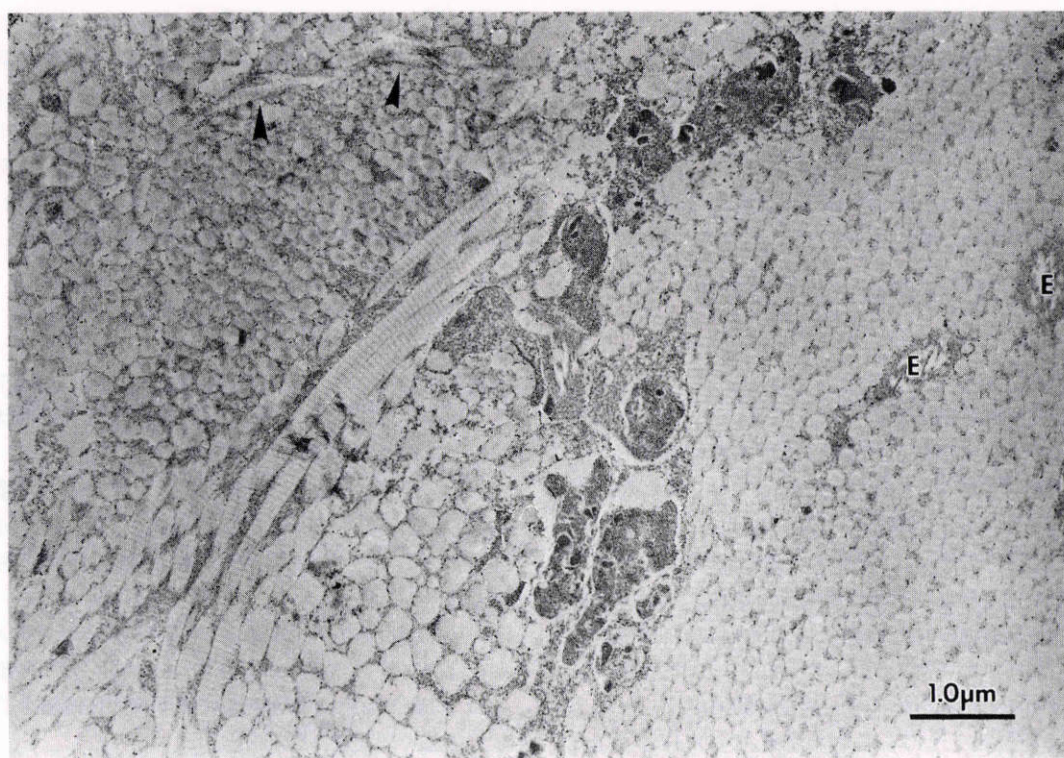


図2 Nanophthalmos 眼強膜の電子顕微鏡所見 (CB 染色).
Nanophthalmos 眼強膜. 一般に比較的小さい膠原線維が密に配列しており, その所々に大小不同の不規則な配列をした膠原線維の一群が島状に認められる. また横断面の集団の中に, 縦断面が突然出現するような配列の乱れた膠原線維が所々に見られる (矢じり). E: 弾性線維 ($\times 14,000$)

ル中)で5分間、3回洗浄。

7) アルコール系列で脱水(50%エタノールから)

8) エポキシ樹脂/酸化プロピレンで浸透。

9) 重合

10) 超薄切片作成、電子染色(酢酸ウラン)。

作成した標本は日立 H-7000 型透過型電子顕微鏡で観察した。

一方、比較すべき正常対照として、脈絡膜悪性黒色腫で眼球を摘出された46歳、および55歳男性の赤道部強膜を用い、以上と同様に処理した。

III 結 果

Nanophthalmos 眼、正常眼とも強膜片に対し垂直な切片を作成し、以下の観察を行った。パラフィン切片の HE 染色標本、およびエポキシ切片のトルイジンブルー染色標本では、正常眼の強膜の膠原線維による層状構造は規則正しく、重層化しているのに対して、nanophthalmos 眼では配列が著しく乱れ屈曲していた(図1)。また各象限の強膜片ごとに明かな差は認めなかった。

一方、CB 染色を行った標本(各象限ごとに1~2個)を透過電顕によって観察した結果では、まず膠原線維に関して、層状構造が不明瞭であった。低倍で観察すると、膠原線維が、均質に密に配列した部分と、大きめの線維が不規則に存在した部分とが認められた(図2、図3b)。密に配列していた部分では、正常に比べ膠原線維同士の間隔がより密であった。また膠原線維の横断面が集合している部に、突然、縦断する線維が出現するような異常な走行する膠原線維が所々に見られた(図2、図3a)。一方、太い、不規則な膠原線維が集合した部位では、これらの線維の周囲は細かい線維状の物質が取りまいていた。この部位では膠原線維大小不同が著しく、その直径は正常眼では80~240 nm であるのに対して、50~350 nm であった。密に配列した部位では60~200 nm とむしろ小さめで均等であった。異常な部位では膠原線維そのものにも異常が見られ、横断面で円形でなく、不規則なものが多く、縦断面では、線維の分岐やねじれが認められた。

CB 陽性物質に関しては、小さいフィラメント状の物質が、正常眼と同様に多数膠原線維に付着していた(図2~4)。正常眼(図4a, c)で、膠原線維の断面を観察すると、線維に沿って規則正しく配列する電子密度の低い小さいフィラメントと、不規則に存在している電子密度の高いフィラメントがあり、両者のコン

トラストは明瞭である。しかし、nanophthalmos 眼(図4b, d)では電子密度の高いフィラメントと低いフィラメントが認められるが、何れも正常眼に比較し電子密度が低く、両者の区別は必ずしも明かではなかった。また膠原線維と横断面からも、正常眼では多数のフィラメントが取りまいているのに対して、nanophthalmos 眼では明らかにまばらであり、線維同志の間隔もわずかであった。不規則な配列の部の膠原線維を取りまく線維状物質中には、明かなCB陽性物質は確認できなかった。以上の電子顕微鏡の所見も標本の採取部位による差は明かではなかった。

IV 考 按

既に nanophthalmos の強膜の組織所見に関する報告は、いくつかあり、光学顕微鏡、電子顕微鏡による形態学的検討^{4)~8)}だけでなく、組織培養による研究^{9)~7)}や、プロテオグリカンやフィブロネクチンに関する組織化学的研究^{4)~7)}など様々な角度から検討されている。これまでの報告をまとめると、まず Trelstad ら³⁾は膠原線維は配列が乱れ、線維の周囲にはプロテオグリカン類似物質の沈着が見られると報告した。また Yue ら⁴⁾⁵⁾は“twisted within bundle”と呼ばれる膠原線維のねじれや、活性の高い線維芽細胞の存在などを示し、また培養強膜細胞では、膠原線維などの産生には正常眼と差がなく、グリコサミノグリカンの産生は著明に減少、フィブロネクチンが大量に分泌されたと報告している。さらに Ward ら⁶⁾は電顕所見として膠原線維の隙間にルテニウム赤で強く染まる、おそらくムコ多糖体の存在していること、強膜細胞での疎面小胞体の肥大、培養強膜細胞でのグリコーゲン様の沈着物質を興味ある3つの所見と挙げている。最近では Stewart ら⁷⁾が、10例の強膜組織標本を電顕的に観察し、うち7例に局所的な膠原線維の枝分れや分割などの異常が認められたと報告している。

今回の結果では、まず形態変化として電顕レベルで、膠原線維が密に配列する部と、大きめの線維が不規則に存在する部があり、全体としても強膜片に対して垂直な切片を作成したにも関わらず、正常眼のような層状構造は明かではなかった。また明かな走行異常を示す膠原線維が見られたり、径の大小不同や変形、‘fraying’と称されるような分岐が認められた。膠原線維の径に関して、密に配列した部分ではむしろ正常眼より小さめ、かつ均等で、異常な部分では大きい線維が認められ、大小不同が著しかった。これらは基本的

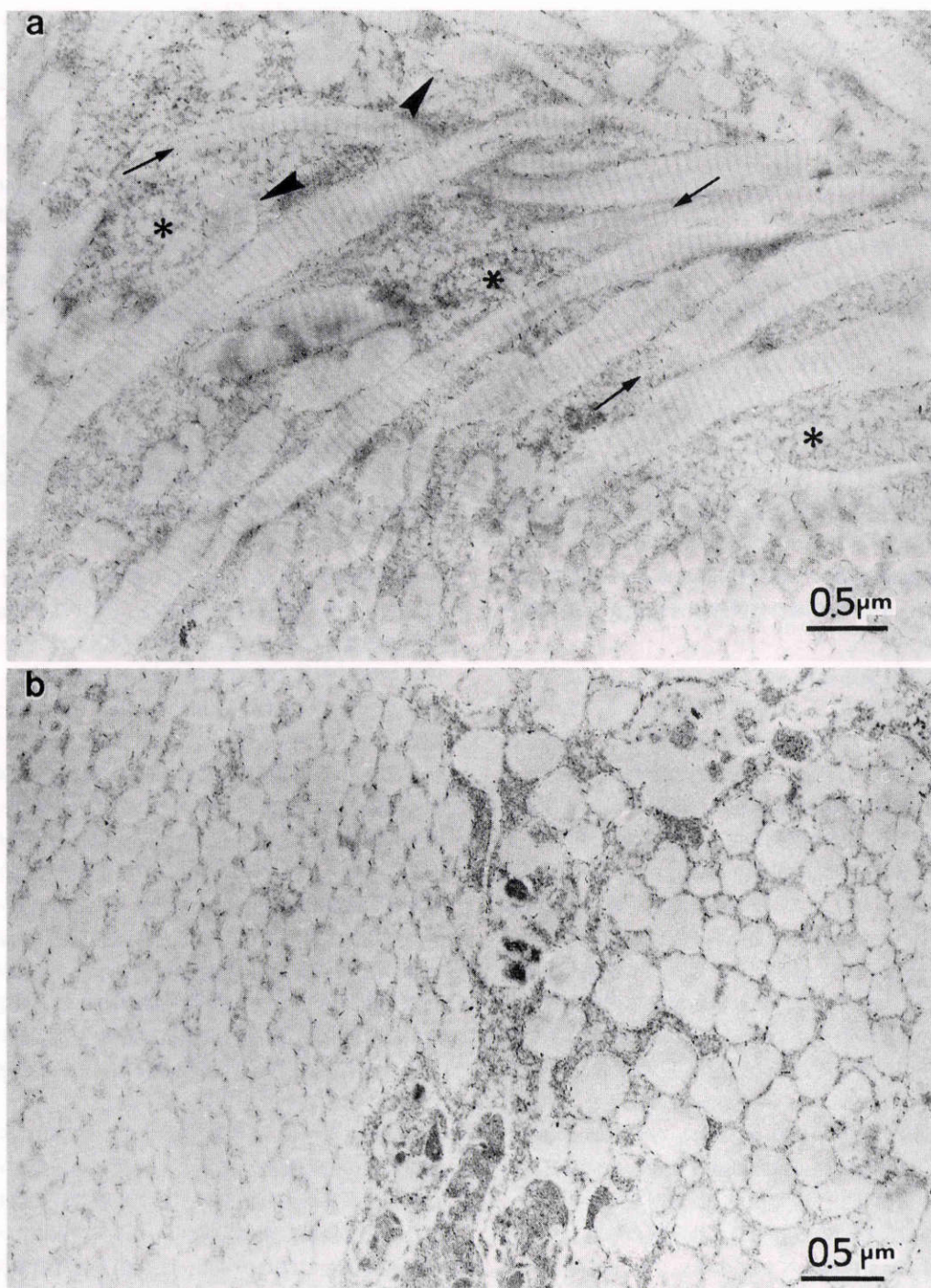


図3 Nanophthalmos眼強膜の電子顕微鏡所見 (CB染色).

a: 膠原線維が、不規則に配列をする部分では、膠原線維の大小不同が著しく、これらの線維の周囲は細かい線維性物質で取り囲まれている。この線維性物質の中には、CB陽性のフィラメントはわずかしき認められていない(*). 個々の線維にも、ねじれ(矢じり)や分離(矢印)などの異常所見が認められる。b: 比較的細い、均等な膠原線維が密に配列する部と、大小不同の線維が不規則に配列する部とが認められた。(いずれも $\times 25,000$)

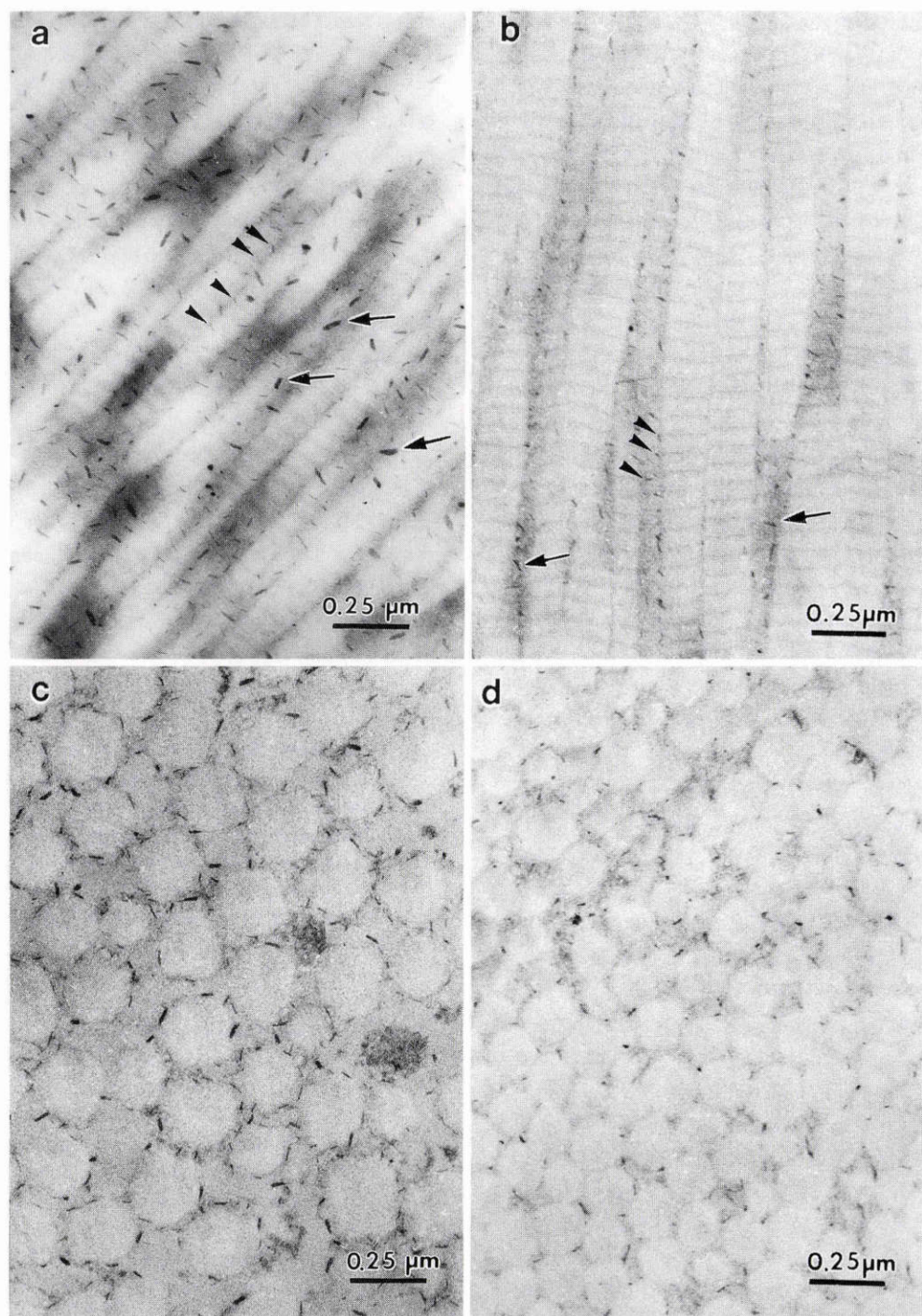


図4 正常眼ならびに nanophthalmos 眼における強膜（膠原線維）の電子顕微鏡所見（CB 染色）。
 a, c: 46 歳正常眼強膜, b, d: nanophthalmos 眼強膜, a, b: 膠原線維を縦断する切片, c, d: 膠原線維を横断する切片。
 a に比較し, b では CB 染色陽性のフィラメントは数も少なく, また電子密度も低い, また a では CB 染色によって, 電子密度の高い不規則なフィラメント（矢印）と, 比較的低い膠原線維に規則的に付着するフィラメント（矢じり）とが認められるが, b ではフィラメント間に同様の差は認められるが, 全体に電子密度が低く, 正常眼ほどコントラストは認めない, c では膠原線維同士に隙間があり, ここに CB 染色陽性のフィラメントが存在している, それに対して d では膠原線維同士の隙間がわずかで, CB 染色陽性物質もわずかで, 電子密度も低い, (いずれも $\times 46,000$)

にはこれまでの報告と同様と考えられた。

ところで、今回用いたCBは強く陽性荷電した銅色素で、プロテオグリカン、特に硫酸化されたプロテオグリカンにはほぼ特異的に付着し、電子顕微鏡レベルで電子密度の高いフィラメント、もしくは点状物として認められる^{14)~17)}。人眼の正常強膜をCBで染色した所見についてはわずかにYoung¹⁴⁾の報告が見られるのみで、膠原線維に規則正しく配列する電子密度の低い、小型のフィラメントと、不規則に分布する電子密度の高い大型のフィラメントが認められることを示した。しかし、現在のところ、nanophthalmosをはじめとする種々の強膜疾患で、CB染色の結果を示した報告は見られていない。

今回1症例のみでの検討であるが、CB染色の結果については、全体に正常眼に比べCB染色は弱く、数も減少していた。またnanophthalmos眼においても、正常眼の電子密度の高いフィラメントと、低いフィラメントにあたると思われるフィラメントは認められたが、一般に電子密度が低く、小さめであった。またWardら⁶⁾の報告に類似した沈着物も認められたが、この部にはCB陽性物質はわずかであった。これまでの報告では、プロテオグリカンに関して、アルシアンブルーで強く染まるとか、ルテニウムレッド陽性物質の沈着など、Yueら⁴⁾⁵⁾の報告を除き、一般に増加する、もしくは部分的に沈着するとの報告が多く、生化学的にこれらはコンドロイチンもしくはデルマトン硫酸と考えられてきた。しかし、今回の結果はそれに反してCBによる染色物質は低下していた。この点についてStewart⁷⁾の報告のように、症例ごとに強膜所見にかなりの差があることも考えられ、またCBが硫酸基に特異的に付着することを考えると、この症例のプロテオグリカンは、硫酸化の低いプロテオグリカンである可能性が考えられる。しかし、アルシアンブルーやルテニウムレッドは必ずしもプロテオグリカンに特異的な色素ではなく、Wardら⁶⁾の示した沈着物は、むしろフィブロネクチンである可能性もあり、Yueらの説のようにプロテオグリカンはむしろ減少しているのかもしれない。

硫酸化プロテオグリカンは、生体内で様々な機能を果たしている^{15)~17)}。特に代表的なものとして膠原線維に付着し、線維同士をつなぎ合わせたり、互いの間隔を維持する機能、また一方では、含水量の維持などの機能が挙げられる。硫酸化プロテオグリカンは強い陰性荷電を持っていることから、互いに反発し、これが

付着した膠原線維同士の間隔を一定に保っていると考えられている。今回の症例では、膠原線維の隙間に存在する硫酸化プロテオグリカンは少なく、また膠原線維はより間隔が密であるということから、両者の関係は相関しており、やはりプロテオグリカンは減少していると考えられるべきと思われる。

Yueら⁵⁾は膠原線維の異常なpackingの原因としてフィブロネクチンの増加による接着力の亢進も考えられると述べている。これらの所見とuveal effusionの具体的な関係は不明である。しかし、プロテオグリカンが減少することによって、膠原線維の間隔が密になり、いわゆるuveoscleral flowの抵抗が大きくなっていること、またプロテオグリカンは強い水分の吸着能力を持つことから、強膜の含水量が低下していることなどが推定され、uveal effusionの発症と何らかの関係が示唆される。いずれにしろ、膠原線維だけでなくプロテオグリカンにも異常が認められ、nanophthalmosのある症例では、強膜のこれらの成分によって行われるべき機能にも異常を伴っている可能性があり、uveal effusionの発症の因子の一つとして関与していることが推定される。

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, Silberman NN, Brockhurst RJ: Nanophthalmic sclera. Ultrastructural, histochemical, and biochemical observation. Arch Ophthalmol 100: 1935-1938, 1982.
- 4) Yue BYJT, Goldberg MF, 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 MF, Duvall J, Tso MOM, Sugar J: Nanophthalmic sclera. Fibronectin studies. Ophthalmology 95: 56-60, 1988.
- 6) Ward RC, Gragoudas ES, Pon DM, Albert DM: Abnormal scleral findings in uveal effusion syndrome. Am J Ophthalmol 106: 139-146, 1988.
- 7) Stewart 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.
- 8) **Gass JDM**: Uveal effusion syndrome; a new hypothesis concerning pathogenesis and technique of surgical treatment. *Retina* 3: 159—163, 1983.
- 9) **Forrester JV, Lee WR, Kerr PP, Dua HS**: The uveal effusion syndrome and trans-scleral flow. *Eye* 4: 354—365, 1990.
- 10) **Scott JE, Haigh M**: "Small"-proteoglycan collagen inter-actions: Keratan sulfate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the "a" and "c" bands. *Biosci Rep* 5: 756—766, 1985.
- 11) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Chang I, Sugar J, Robin J**: Proteoglycan molecules in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1846—1853, 1991.
- 12) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Iwata K, Fukuchi T, Kaiya T**: Sulfated proteoglycan in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2388—2398, 1992.
- 13) 福地健郎, 沢口昭一, 原 浩昭, 岩田和雄, 海谷忠良: サル眼の視神経節状板における Sulfated proteoglycan. *眼紀* 42: 1780—1784, 1991.
- 14) **Young RD**: The ultrastructural organization of proteoglycans and collagen in human and rabbit scleral matrix. *J Cell Sci* 74: 95—104, 1986.
- 15) **Hasacall VC, Hascall GK**: Proteoglycan. In: Hay DH (Ed): *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York, 39—63, 1981.
- 16) **Hay ED**: Extracellular matrix. *J Cell Biol* 91: 205—223, 1981.
- 17) **Ruoslahti E**: Structure and biology of proteoglycans. *Ann Rev Cell Biol* 264: 229—255, 1988.
-