

# 発達期人眼の前房隅角の発生に関する組織化学的・ 電子顕微鏡的研究

—線維柱帯の形成とグリコサミノグリカンの変化—

谷野 富彦<sup>1)</sup>, 樋田 哲夫<sup>2)</sup>, 東 範行<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>杏林大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup>国立小児病院眼科

## 要 約

胎齢5週から22週までの人眼標本63眼を使用し、隅角の発生につき組織化学的・電子顕微鏡的に検索した。胎齢8週から10週の初期では間葉細胞が角膜原基と虹彩原基の間に存在し、相互に接触しすでに細胞間にはデスモゾーム様の接着装置を認めた。これらの細胞は次第に伸長し接着装置も多くなり、胎齢20週頃にはシュレム管、傍シュレム管結合織が認められ、一部線維柱帯の形成も始まり、成人と近似した形態となった。グリコサミノグリカンについては初期はヒアルロン酸、後期はコンドロイチン硫酸とデルマトン硫酸が多く存在すると考えられた。電子顕微鏡的には胎齢15週頃に細胞間に認めた著明なルテニウムレッド染色陽性物質は発達に伴い減少した。このことは、発達期においてもグリコサミノグリカンが房水流出抵抗に関係している可能性を示唆するものと思われた。(日眼会誌 97:310-317, 1993)

キーワード：発達期ヒト隅角，グリコサミノグリカン，組織化学，電子顕微鏡学，酵素消化試験

## Histochemical and Electron Microscopic Study of the Formation of Trabecular Meshwork and Changes of Glycosaminoglycans

Tomihiko Tanino<sup>1)</sup>, Tetsuo Hida<sup>2)</sup> and Noriyuki Azuma<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Kyorin University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, National Children's Hospital

## Abstract

The development of iridocorneal angle and trabecular tissue was investigated histochemically and electron microscopically. Sixty-three human eyes at from 5 to 22 weeks of gestation were used in this study. For identifying glycosaminoglycans, alcian blue staining and enzyme digestion methods with hyaluronidase and chondroitinase AC and ABC were carried out light microscopically. Electron microscopically, specimens were stained with ruthenium red. In the early stage from 8 to 10 weeks, mesenchymal cells between the primordium of the cornea and the iris became elongated and connected with one another. Desmosome-like junctional complexes were observed in these cells. Schlemm's canal and paracanalicular tissue were observed at 20 weeks and the structure of the meshwork became similar that of adults. From findings of enzyme digestion methods, glycosaminoglycans in trabecular tissue seemed to be mainly hyaluronic acid in the early stage, which was replaced by chondroitin

別刷請求先：160 新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 谷野 富彦  
(平成3年8月19日受付，平成4年9月11日改訂受理)

Reprint requests to: Tomihiko Tanino, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine Keio University, 35 Shinano-machi, Shinjuku-ku 160, Japan

(Received August 19, 1991 and accepted in revised form September 11, 1992)

sulfate and dermatan sulfate afterwards. Substances positive for ruthenium red, which seemed to be glycosaminoglycans, was observed in intercellular spaces electron microscopically. They decreased according to development. These findings indicated that the beginning of aqueous outflow might be related to the decrease of glycosaminoglycans in trabecular tissue. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 310-317, 1993)

**Key words:** Developing human trabecular tissue, Glycosaminoglycan, Histochemistry, Electron microscopy, Enzyme digestion method

## I 緒 言

隅角線維柱帯の発生に関しては、過去に多くの報告が行われており、それによると人眼では胎齢 15 週頃から形成が始まり、胎齢 28 週頃までに完成するとされている<sup>1)-9)</sup>が、その詳細についてはなお不明な点が少ない。一方、グリコサミノグリカンは一般に細胞、間質の構築に重要であり、発達期においては細胞の誘導に関して重要な行動を果たしていると言われている<sup>10)</sup>。近年、さらにグリコサミノグリカンは隅角領域において房水の流出抵抗と関連をもっていることが指摘されるようになり<sup>11)-15)</sup>、開放隅角緑内障ではこれが増加していることが知られている<sup>16)</sup>。しかしながら発達期における隅角領域のグリコサミノグリカンの検討はまだなされていない。今回我々は、人眼隅角線維柱帯の発生につき組織化学的・電子顕微鏡的に検索し、さらにグリコサミノグリカンに対しても検討したのでここに報告する。

## II 試料および方法

試料は胎齢 5 週から胎齢 22 週までの人眼標本を光学顕微鏡用として 52 眼、電子顕微鏡用として 11 眼を使用した(表 1)。これらの眼球標本は死体解剖保存法にそって入手したものであり、胎齢は妊娠週数から算定し、各眼組織の発達の程度をもってその裏付けとした。光学顕微鏡用試料は 4%パラホルムアルデヒド 50 mM リン酸緩衝液で 3 日間固定し、一部の標本はグリコサミノグリカンの流出を防止するため 1%塩化セチルピリジニウムを固定液に加えた。これらはエタノール系列で脱水した後パラフィンに包埋した。電子顕微鏡用試料は 2%グルタルアルデヒド 100 mM カコジル酸緩衝液で 3 時間、ついで 1%四酸化オスミウム 100 mM カコジル酸緩衝液で 1 時間固定し、エタノール系列で脱水したのちエポキシに包埋した。光学顕微鏡的には各パラフィン標本の 3 μm 連続切片を作成し

表 1 各胎齢における人眼球標本数

胎 齢	眼数	胎 齢	眼数
胎齢 5 週	4(1)	胎齢 14 週	4(1)
6	6(1)	15	0(1)
7	5(1)	16	3(1)
8	6(1)	17	1(1)
9	6	18	1
10	4	19	1
11	1	20	3(1)
12	2(1)	21	1
13	3	22	1(1)

括弧外：光学顕微鏡用試料数

括弧内：電子顕微鏡用試料数

HE 染色、マッソントリクローム染色、アルシアンブルー染色 (pH 2.5) を行った。超微形態はエポキシ包埋標本の超薄切片を作成し、酢酸ウラン・クエン酸鉛染色した後、電子顕微鏡下に観察を行った。

また、グリコサミノグリカンに関しては光学顕微鏡的にはアルシアンブルー染色 (pH 2.5) を行い、放線菌ヒアルロニダーゼ消化試験<sup>17)-19)</sup>およびコンドロイチナーゼ消化試験<sup>20)21)</sup>によってその種類を検討した。ヒアルロニダーゼ消化試験は切片を脱パラフィン後、放線菌ヒアルロニダーゼ (生化学工業) 100 TRU/ml を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) で 40°C、5 時間処理し、そのアルシアンブルー染色性を酵素を含まない同緩衝液、および蒸留水で処理した切片と比較した。ヒアルロニダーゼによって消化されない場合は、同眼球的隣接切片をコンドロイチナーゼ AC あるいは ABC (生化学工業) 5 U/ml を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0 あるいは 7.5) でそれぞれ 37°C、2 時間処理し、そのアルシアンブルー染色性を酵素を含まない同緩衝液、および蒸留水で処理した切片と比較した。電子顕微鏡的にはルテニウムレッド染色を施行した。標本固定時に 2%グルタルアルデヒド溶液および次の洗浄カコジル酸緩衝液において 1%ルテニウムレ

ドを混合して染色を行い、ついで1%四酸化オスミウムにて後固定し通常の方法でエポンに包埋した。これらは他の標本とともに比較、観察しその局在を検討した。

### III 結 果

発達初期胎齢6~9週の光学顕微鏡所見では表層外胚葉と水晶体間に間葉細胞が入り、隅角線維柱帯や虹彩ははまだ全く形成されていなかった(図1, 2)。この時期の電子顕微鏡所見ではこの部位に未熟な間葉細胞が多数認められた。しかし、これらは既に一部は細胞同士が相互に接着し、その間にデスモゾーム様の細胞間接着装置が見られた。細胞間にはコラーゲンと思われる細線維を認めた(図5, 6)。

胎齢12~15週ごろになると角膜と虹彩はかなり形成されてきたが、隅角線維柱帯の構造は光学顕微鏡下でもいまだ不明瞭であった(図3)。電子顕微鏡的には間葉細胞は長い胞体を有し、一部は伸長し、さらに互いの接着が認められた。細胞間には多数のコラーゲン細線維が出現し、細胞間隙は胎齢6~9週に比して開大していた(図7, 8)。

胎齢20週になると光学顕微鏡では細胞成分の減少と一部層板の形成およびシュレム管と傍シュレム管結合組織が認められ、角強膜網、ぶどう膜網への分化は不十分ではあるが、傍シュレム管結合組織とは明らかに区別して存在した(図4)。電子顕微鏡所見では間葉細胞はさらに相互に伸長、接触し、各細胞間にはデスモゾーム様の接着装置が多数見られ、細胞間隙はさら

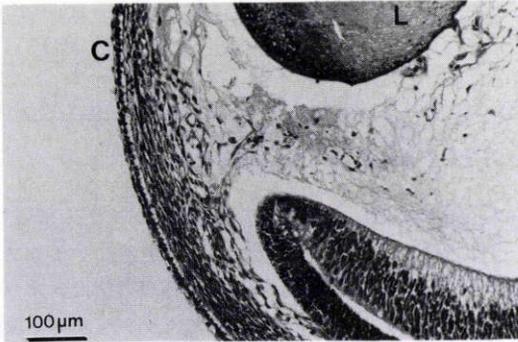


図1 胎齢6週の眼杯前縁。

水晶体と眼杯前縁の間に間葉細胞が見られるが、角膜、虹彩は形成されていない。(C:角膜原基, L:水晶体原基)(HE染色, ×100)

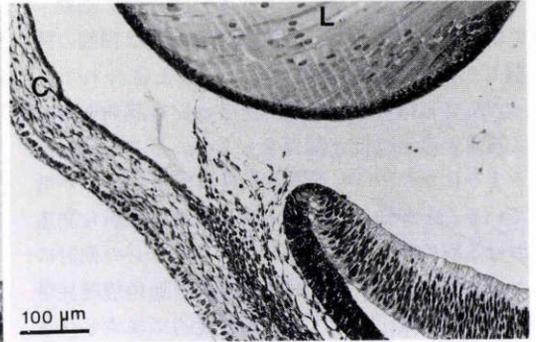


図2 胎齢8週の眼杯前縁。

角膜や虹彩は形成されているが、隅角線維柱帯やシュレム管ははまだ明らかでない。(C:角膜, L:水晶体)(HE染色, ×100)



図3 胎齢12週の隅角部。

虹彩や毛様体の発生が始まっている。隅角は形成されつつあるが、いまだシュレム管や線維柱帯はみられない。(C:角膜, L:水晶体)(HE染色, ×100)

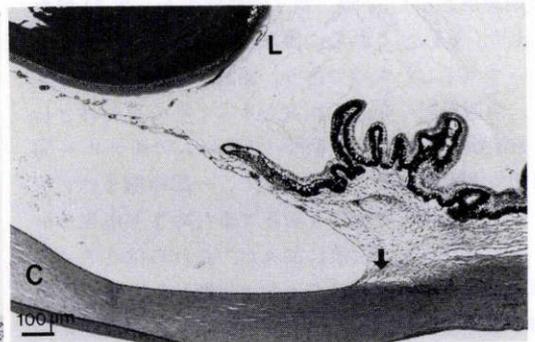


図4 胎齢20週の隅角部。

毛様体や虹彩、角膜の発達とともに隅角には線維柱帯とシュレム管が認められる。(C:角膜, L:水晶体, 矢印:シュレム管)(HE染色, ×100)

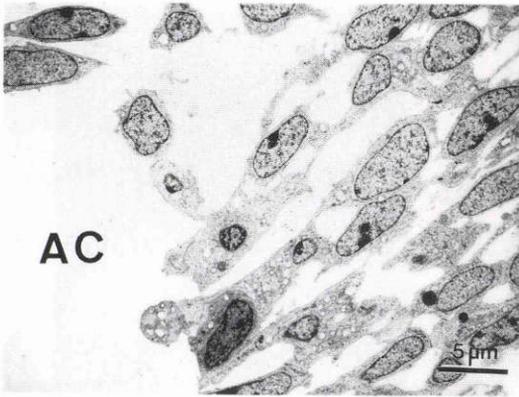


図5 胎齡9週の隅角領域の電子顕微鏡所見。  
間葉細胞は互いに接着している。(AC:前房)  
(×1,750)

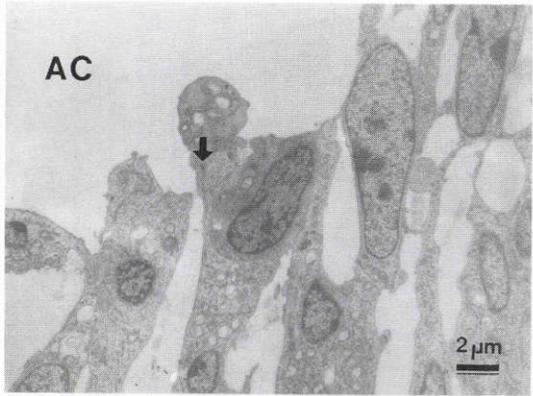


図6 図5の強拡大所見。  
細胞間にデスモゾーム様の接着装置が認められる。  
(AC:前房, 矢印:デスモゾーム様の接着装置)  
(×2,850)

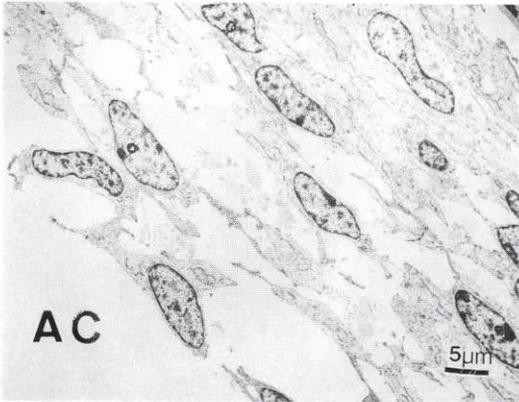


図7 胎齡15週の隅角部。  
細胞は伸長し、間隙は拡大し、細胞間に多数のコラーゲン線維がみられる。(AC:前房)(×1,150)

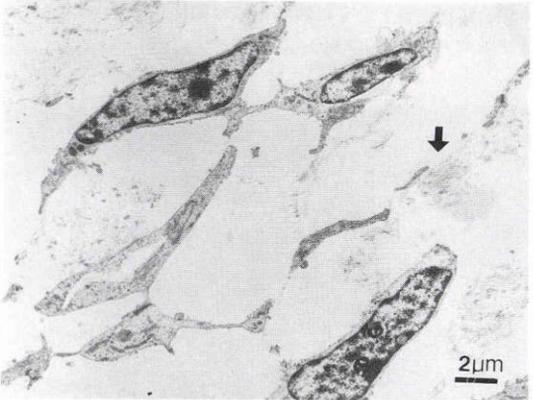


図8 図7の強拡大所見。  
細胞間に周期を有するコラーゲンが多数みられる。(矢印)(×2,700)

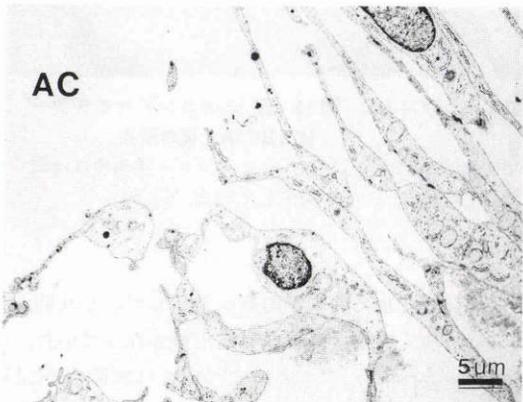


図9 胎齡20週の隅角部。  
細胞はさらに伸長し、互いに接着し、網目構造を形成している。(AC:前房)(×2,700)

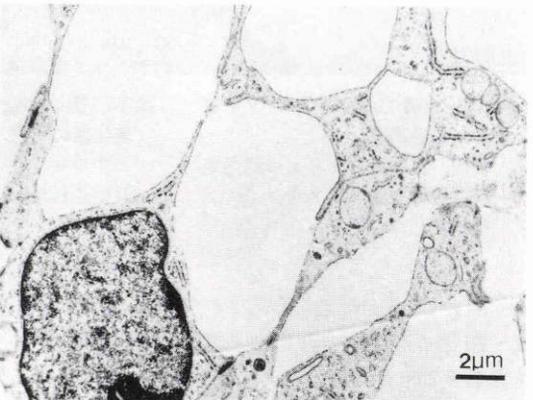


図10 図9の強拡大所見。  
多数の伸長した胞体が複雑に接着している。(×6,700)

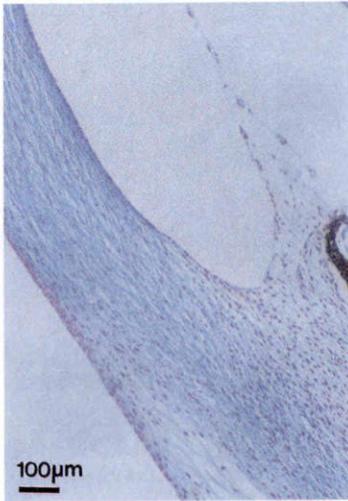


図 11 胎齢 14 週のアルシアンブルー染色所見。  
角膜、虹彩実質とともに隅角組織は陽性を示す。(アルシアンブルー染色, ×60)



図 12 図 11 のヒアルロニダーゼ消化後の所見。  
角膜、虹彩、隅角組織のアルシアンブルー染色性は減弱している。(×60)

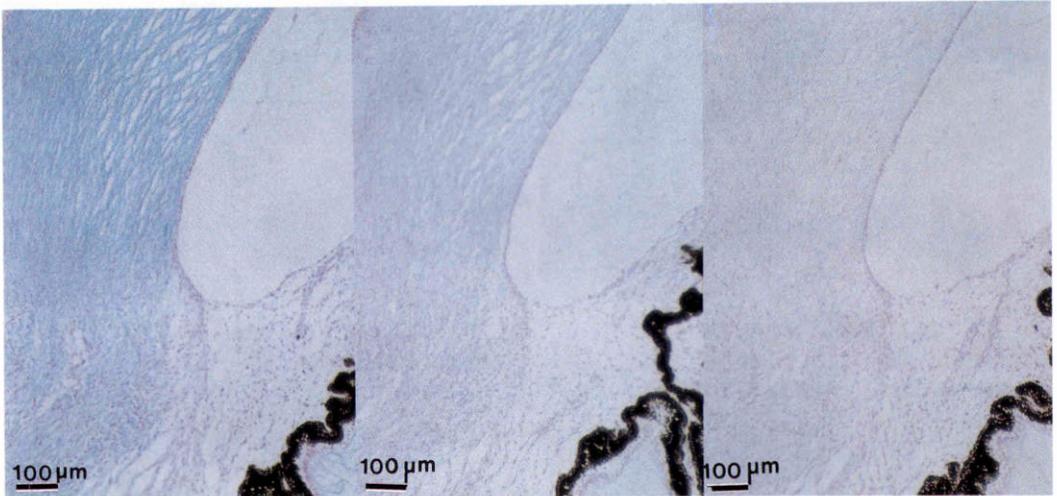


図 13 胎齢 17 週のアルシアンブルー染色所見。  
角膜、虹彩実質とともに隅角組織は陽性を示す。(アルシアンブルー染色, ×60)

図 14 図 13 のヒアルロニダーゼ消化後の所見。  
ヒアルロニダーゼでは完全には消化されなかった。(×60)

図 15 図 13 のコンドロイチナーゼ ABC 消化後の所見。  
アルシアンブルー染色性はほぼ消失している。(×60)

に大きく開大し、網目構造が形成されていた。しかし、胎齢 6~20 週のいずれの時期にも壊死した細胞やこれらを貪食するマクロファージなどの細胞は見られなかった(図 9, 10)。このように胎齢 20 週頃には、隅角線維柱帯の構造はシュレム管、傍シュレム管結合組織が認められ、角強膜網には線維柱帯の形成も始まり、

それ以前に単に間葉系細胞が存在している状態から比較して成人とかなり近似した形態となっていた。

グリコサミノグリカンについては胎齢 5~12 週ごろまでは隅角組織はアルシアンブルーで染色された(図 11, 12)。胎齢 12~14 週頃になると隅角組織のアルシアンブルー染色性はヒアルロニダーゼ処理にて減弱

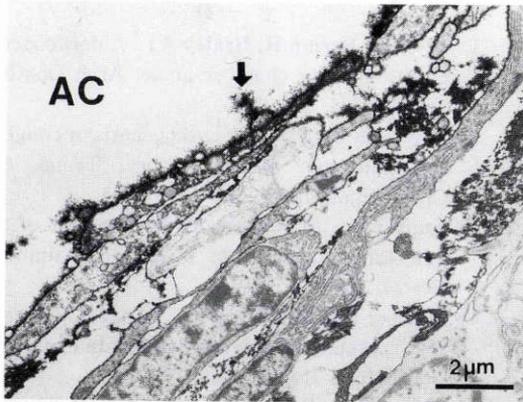


図16 胎齢15週のルテニウムレッド染色所見。

隅角の細胞間には著明な陽性物質の集積(矢印)を認める。(ルテニウムレッド染色,  $\times 5,000$ ) (AC: 前房)

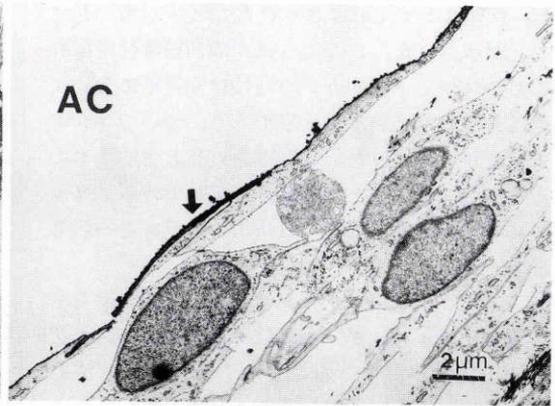


図17 胎齢22週のルテニウムレッド染色所見。

ルテニウムレッド陽性物質は減少し, 細胞表面にわずかに認められる。(ルテニウムレッド染色,  $\times 3,350$ ) (AC: 前房)

するが, 完全には消失しなかった。一方コンドロイチナーゼ処理を行うとほぼ完全な消化が得られた。さらに, 胎齢17~20週頃になるとヒアルロニダーゼによる消化は更に不完全であった。また, コンドロイチナーゼACにても完全な消化は得られなかったが, コンドロイチナーゼABCにてほとんどが消化された(図13, 14, 15)。周産期に至るとヒアルロニダーゼではほとんど消化されず, コンドロイチナーゼACにても完全な消化は得られなかったが, コンドロイチナーゼABCで消化されたため, 大部分はコンドロイチン硫酸, デルマタン硫酸となっているものと思われた。

電子顕微鏡下にグリコサミノグリカンの局在をルテニウムレッド染色で検討すると, 胎齢15週頃では著明な陽性物質が隅角部に存在する細胞間に認められた。これらは発達に伴い減少がみられ, 胎齢22週頃では細胞表面ないしはコラーゲン細線維周囲に陽性物質が存在するのみであった(図16, 17)。

#### IV 考 按

隅角線維柱帯の発生に関しては従来猿眼や人眼で光学顕微鏡下, 電子顕微鏡下に検討されている<sup>11-9)</sup>。それによると人眼の電子顕微鏡所見では胎齢15週ごろから形成が始まり, 胎齢20週以降シュレム管が急速に発達し, 胎齢26週頃からシュレム管が完成してこの頃から房水の流入が始まると推測されている。線維柱帯の形成については中胚葉組織が分割して形成されるという説<sup>12)</sup>と中胚葉組織が再配置され細胞間隙が開大されて形成されるという説<sup>34)</sup>の2説がある。また, ぶど

う膜網, 角強膜網に関しては発生的には毛様体の上皮性部と同様, 神経外胚葉の関与もあるとされている。今回我々の検討では壊死した細胞やこれらを食する細胞は見られず, 早期より網目構造を形成していた。このことは細胞が再配置され間隙が開大され隅角線維柱帯が形成される説を支持するものと考えられる。

グリコサミノグリカンは発達期初期の細胞の誘導に関与していると言われており, また一般にはコラーゲンの産生に関し, プロコラーゲンが細胞外において重合する際に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>10)24)</sup>。今回我々は発達期におけるヒト隅角線維柱帯のグリコサミノグリカンの分布を検討し, 角膜, 強膜においてコラーゲンが急速に増加している時期に一致して, グリコサミノグリカンの著明な蓄積を認めた。これらはコラーゲンが盛んに産生されている時に合わせてグリコサミノグリカンも多く産生されていることと一致している<sup>9)25)</sup>。

さらにグリコサミノグリカンの種類をヒアルロニダーゼ, コンドロイチナーゼACおよびコンドロイチナーゼABCによる消化試験により検討した結果, 隅角線維柱帯に存在するグリコサミノグリカンは胎齢5~12週ではヒアルロニダーゼ処理によってほとんど消化されることよりその大部分はヒアルロン酸であると考えられた。胎齢12~14週になると隅角組織にはヒアルロン酸に加えてコンドロイチン硫酸が出現しているものと思われた。さらに胎齢17~20週になると隅角線維柱帯に存在するグリコサミノグリカンはヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸, デルマタン硫酸の混在で

あるが、次第にコンドロイチン硫酸の比率が増加していることが示された。このように、隅角線維柱帯に存在するグリコサミノグリカンの種類は発達期において初期では大部分がヒアルロン酸であり、ついでコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸へと変化してゆくものと考えられた。このことは角膜、強膜におけるグリコサミノグリカンの推移に関する過去の知見にも一致している<sup>20)21)</sup>。

一方、グリコサミノグリカンに関して Barany ら<sup>11)</sup>がウシ睾丸ヒアルロナーゼ溶液を前房に還流した後房水流出抵抗が減少することを初めて報告して以来、房水の流出抵抗に重要な役割を果たしていることが知られるようになった<sup>12)~15)</sup>。さらに Armaly ら<sup>16)</sup>は開放隅角緑内障患者の前房隅角には非常に多くのグリコサミノグリカンが存在することを示し、グリコサミノグリカンが眼圧の調節に関与することが数多く報告されている。また、房水流出抵抗がおもにどこの部位に存在するかはこれまでさまざまに議論されてきたが、現在では傍シュレム管組織が最大抵抗の場として考えられている<sup>22)</sup>。田原ら<sup>23)~25)</sup>は正常人眼の隅角線維柱帯のグリコサミノグリカンの局在およびその機能に関して研究し、傍シュレム管組織、基板、細線維様物質に分布するグリコサミノグリカンが房水流出抵抗に関係していると報告している。

今回発生期における隅角部のグリコサミノグリカンの変化をこの点から検討すると、電子顕微鏡的にはその量の減少が認められ、また質的にはその構成成分は消化試験の結果より初期にはヒアルロン酸の割合がほかのグリコサミノグリカンに比して多いが、発達にともない胎齡 20 週頃からヒアルロン酸の割合は減弱し、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸が主たる構成成分となるものと考えられた。従来、房水流出は胎齡 20 週頃から始まるものと考えられており<sup>6)27)</sup>、今回の所見はこの時期とも一致している。

形態学のみからは動的機能に関しては十分言えないものの、線維柱帯が急速に発達し、シュレム管内に房水の流入が始まる時期に一致してグリコサミノグリカンの種類の変化および細胞外における減少が見られたことは、発達期においてもグリコサミノグリカンが房水流出抵抗に関係している可能性を示すひとつの所見となるかと思われる。したがって今後正常の発達期のみならず、発達緑内障等の小児期の緑内障研究においてグリコサミノグリカンの分布を検討することも必要なものと考えられる。

## 文 献

- 1) Allen L, Burian H, Braley A: A new concept of the anterior chamber angle. Arch Ophthalmol 53: 783-798, 1955.
- 2) Maumenee AE: The pathogenesis of congenital glaucoma. A new theory. Trans. Am Ophthalmol Soc 56: 507-570, 1958.
- 3) Kupfer C: A note on the development of the anterior chamber angle. Invest Ophthalmol 8: 69-74, 1969.
- 4) Smelser GK, Ozanics V: The development of the trabecular meshwork in primate eye. Am J Ophthalmol 71: 366-385, 1971.
- 5) Reme Ch, d'Epinay SL: Periods of development of the normal human chamber angle. Doc Ophthalmol 51: 241-269, 1981.
- 6) Wulle KG: The development of the productive and draining system of the aqueous humor in the human eye. Adv Ophthalmol 26: 296-355, 1972.
- 7) Tawra A, Inomata H: Developmental immaturity of the trabecular meshwork in juvenile glaucoma. Am J Ophthalmol 98: 82-97, 1984.
- 8) 溝上國義: 前房隅角組織の発生. あたらしい眼科 7: 1573-1578, 1990.
- 9) Ruano-Gil, Costa-Vila, Barastegui: Arrangement of the sclerocorneal system in human fetus. Acta Anat 127: 223-236, 1986.
- 10) 梶川欽一郎: 結合組織. 金原出版, 東京, 325-336, 1984.
- 11) Barany EH, Scotchbrook S: Influence of testicular hyaluronidase on the resistance to flow through the angle of the anterior chamber. Acta Physiol Scand 30: 240-249, 1954.
- 12) Zimmerman LE: Demonstration of hyaluronidase-sensitive acid mucopolysaccharide. Am J Ophthalmol 44: 1-4, 1957.
- 13) 瀬川雄三: 線維柱組織における酸性粘液多糖類の局在. 臨眼 24: 363-367, 1970
- 14) Grierson I, Lee WR: Acid mucopolysaccharides in the outflow apparatus. Exp Eye Res 21: 417-431, 1975.
- 15) Mizokami K: Demonstration of masked acidic glycosaminoglycans in the normal human trabecular meshwork. Jpn J Ophthalmol 21: 57-71, 1977.
- 16) Armaly MF, Wang Y: Demonstration of acid mucopolysaccharides in the trabecular meshwork of the rhesus monkey. Invest Ophthalmol 14: 507-516, 1975.
- 17) 山田和順: ムコ多糖の組織化学的研究. 蛋白質核

- 酸酵素 17: 775—790, 1967.
- 18) **Yamada K**: Effects of novel streptomycetes hyaluronidase digestion upon some mucopolysaccharide staining of cartilages and aortas in the rabbit and rat. *Histochemie* 27: 277—289, 1971.
  - 19) **Sasai Y**: Identification of unidividual acid mucopolysaccharide in tissue sections. *Tohoku J Exp Med* 105: 101—110, 1971.
  - 20) **Anseth A**: Glycosaminoglycans in the developing corneal stroma. *Exp Eye Res* 1: 116—121, 1961.
  - 21) **Toole BP, Trelstad RL**: Hyaluronate Production and removal during corneal development in the chick. *Develop Biol* 26: 28—35, 1971.
  - 22) **Bill A, Svedbergh B**: Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm: An attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous human in man. *Acta Ophthalmol* 50: 295—320, 1972.
  - 23) **Tawara A, Vaner HH, Hollyfield JG**: Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the human trabecular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2215—2231, 1989.
  - 24) 永井 裕, 梶川欽一郎: コラーゲン—化学, 生物学, 医学—, 南光堂, 東京, 145—153, 1975.
  - 25) 田原昭彦: 隅角のプロテオグリカンと眼圧, あたらしい眼科 7: 1579—1586, 1990.
  - 26) 田原昭彦, Vaner HH, Hollyfield JG: 正常ヒト眼前房隅角組織におけるプロテオグリカンの局在, あたらしい眼科 7: 886—892, 1990.
  - 27) 溝上國義: 隅角の発達と加齢, 山本 節(編): 眼科 Mook 38 眼の発達と加齢, 金原出版, 東京, 86—93, 1989.