

論文内容の要旨

A Novel Multi-Observation System to Study the Effects of Anterior Ocular Inflammation in Zinn's
Zonule Using One Specimen

同一検体を用いたチン小帯における前眼部炎症の影響を研究するための新しい複合的観察系

日本医科大学大学院医学研究科 眼科学分野
大学院生 高橋慶

International Journal of Molecular Sciences 24 卷 7 号 掲載

背景

白内障手術におけるチン小帯脆弱は手術難易度を上げるとともに、水晶体偏位や落下のような術後合併症の原因となる。チン小帯脆弱の先天的な原因としてはマルファン症候群、ホモシスチン尿症などがあり、後天的な原因としては外傷、偽落屑症候群、ぶどう膜炎、硝子体手術後、網膜色素変性症、アトピーなどがある。後天的な原因には炎症が関与していると考えられている。実験的角膜外傷で炎症性浸潤細胞がチン小帯を遊走していることが2020年に報告されているが、いまだその他の報告は少なく、チン小帯脆弱の原因は詳細に検討されていない。チン小帯は細く、弱い組織であり、観察することが極めて困難であることが一因として考えられる。

方法

今回チン小帯の炎症による形態変化とその成因を観察すべく実験系の作成を試みた。

ラットアルカリ外傷モデルを用いて、前眼部炎症を作成した。外傷後7日 (day7) と通常眼 (Normal) で比較した。チン小帯の変化を観察すべく、眼球を前眼部のみにトリミングに固定し、蛍光免疫染色を行なった。その後、融点を低く調整したゼラチンに固定し、4倍程倍率で観察を行った。その後検体をゼラチンごと、パラフィン置換し、薄切後に再度蛍光免疫染色を施行し観察した。さらに詳細に観察すべく、免疫染色、重金属染色を施行し、低真空走査型電子顕微鏡 (LV-SEM) で観察した。また同一パラフィン検体から Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR) 用検体を薄切し、RNA を抽出した。

結果

ゼラチン包埋の所見は、チン小帯マーカーとして Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP1) を用いて行った。外傷後の経過日数に準じて徐々にチン小帯帯蛍光発色が減弱する傾向が見られた。また、外傷後の経過日数に準じて背景蛍光が強調される傾向が見られた。パラフィン切片の蛍光顕微鏡観察では、チン小帯上に遊走する有核細胞を Normal と day7 でいずれも認めた。浸潤細胞を集計し、マクロファージマーカーとして ED-1 陽性細胞、チン小帯分解能マーカーとして matrix metalloproteinase-2 (MMP2) 陽性細胞のそれぞれの内訳を集計した。Normal 群に比較して、day7 群では有意に浸潤細胞が増加していた。また浸潤細胞のほとんどが、ED1 陽性かつ MMP2 陽性細胞であった。LV-SEM では低倍率 (300 倍) 観察による全体的な変化の評価と、高倍率 (1500 倍) による水晶体囊付近の局所変化の評価を行った。低倍率での計測結果では色濃度で normal と day7 群で有意差が認められた。一方で面積比の結果では有意差は認められなかった。また、高倍率での結果は day7 群では、有意にチン小帯は細かった。超高倍率 (8000 倍) でチン小帯上を遊走するマクロファージの形態観察を行った。マクロファージは様々な形に変形しながら、チン小帯を手繰るようにして浸潤している様子が観察できた。またチン小帯の後囊枝に局限した Fibrillar girdle と呼ばれる構造を確認することが出来た。RT-qPCR では Normal 群と day7 群で MMP2 の発現をハウス

キーピング遺伝子として β -actin を用いた $\Delta\Delta$ CT 法で比較した。Normal 群に比べ day7 で MMP2 の発現量は有意に増加していた。

結論

これらの実験系により、チン小帯の形態変化をマクロ的な変化からミクロな変化までシームレスにかつ詳細に確認することが出来た。MMP2 は *in vitro* 実験において MAGP1 を分解する報告があり、上記の結果から MMP2 がチン小帯を分解している事が推察された。また LV-SEM 所見からマクロファージの遊走がチン小帯の形態変化を起こしている像を観察することが出来た。このことから、MMP2 陽性マクロファージは MMP2 によりチン小帯を分解し、さらに遊走による直接的な障害をチン小帯に加えていることが考えられた。